



HANDBUCH

DER

BIOCHEMISCHEN ARBEITSMETHODEN.

BEARBEITET VON

Prof. Dr. **E. Abderhalden,** Halle a. S. — Prof. Dr. **W. Autenrieth,** Freiburg i. Br. — Prof. Dr. **H. Bechhold,** Frankfurt a. M. — Dr. **M. T. Burrows,** New-York — Prof. Dr. **A. Carrell,** New-York — Dr. **Max de Crinis,** Graz — Dr. phil. **Edelstein,** Berlin — Exz. Geh. Rat Prof. Dr. **Emil Fischer,** Berlin — Prof. Dr. **Otto Folin,** Boston — Prof. Dr. **Sigmund Fränkel,** Wien — Prof. Dr. **Führer,** Freiburg i. Br. — Priv.-Doz. Dr. **Fuhrmann,** Graz — Geh. Rat Prof. Dr. **V. Hensen,** Kiel — Prof. Dr. **M. Kumagawa,** Tokio — Priv.-Doz. Dr. **E. Letsche,** Tübingen — Dr. phil. **P. A. Levene,** New-York — Prof. Dr. **Lockemann,** Berlin — Dr. **H. Lohrisch,** Chemnitz — Prof. Dr. **E. S. London,** St. Petersburg — Prof. Dr. **Macallum,** Toronto — Prof. Dr. **Leonor Michaelis,** Berlin — Prof. Dr. **Morawitz,** Freiburg i. B. — Prof. Dr. **Franz Müller,** Berlin — Prof. Dr. **Otto Neubauer,** München — Dr. **M. Nierenstein,** Bristol — Prof. Dr. **Hermann Pfeiffer,** Graz — Dr. **L. Pincussohn,** Berlin — Prof. Dr. **Pohl,** Prag — Prof. Dr. **Pregl,** Innsbruck — Priv.-Doz. Dr. **Ernst G. Pringsheim,** Halle a. S. — Priv.-Doz. Dr. **H. Pringsheim,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Rohde,** Heidelberg — Dr. **P. Rona,** Berlin — Dr. **van Slyke,** New-York — Hofrat Prof. Dr. **J. Stoklasa,** Prag — Prof. Dr. **J. Traube,** Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Völtz,** Berlin.

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. EMIL ABDERHALDEN,

DIREKTOR DES PHYSIOLOGISCHEN INSTITUTES DER UNIVERSITÄT HALLE A. S.

FÜNFTER BAND.

ZWEITER TEIL.

MIT 139 TEXTABBILDUNGEN UND 1 FARBIGEN TAFEL.

URBAN & SCHWARZENBERG

BERLIN — WIEN

N., FRIEDRICHSTRASSE 105b — I., MAXIMILIANSTRASSE 4

1912.



Inhaltsverzeichnis

zum 1. und 2. Teile.



Der Nachweis der Gifte auf chemischem Wege.

Von **W. Autenrieth,** Freiburg i. B.

Allgemeines.

Nach ihrem chemisch-analytischen Verhalten lassen sich fast alle bekannteren Gifte und stark wirkenden Arzneistoffe in eine der folgenden drei Gruppen einreihen:

I. Eine Gruppe umfaßt solche Stoffe, die sich aus angesäuerter, wässeriger Flüssigkeit mit Wasserdämpfen abdestillieren lassen. Hierhin gehören gelber Phosphor, Blausäure, Karbolsäure, Lysol, Chloroform, Jodoform, Chloralhydrat, Anilin, Nitrobenzol, Schwefelkohlenstoff, Alkohol.

II. In eine zweite Gruppe gehören diejenigen organischen Stoffe, die aus angesäuerter wässeriger Lösung mit Wasserdämpfen nicht flüchtig sind, die aber einem Untersuchungsmaterial durch Erhitzen mit weinsäurehaltigem Alkohol entzogen werden können. Diese Gruppe umfaßt die sämtlichen Alkaloide, ferner viele Glukoside und Bitterstoffe, sowie verschiedene der künstlichen stark wirkenden organischen Arzneimittel, wie Azetanilid, Phenazetin, Antipyrin, Pyramidon, Sulfonal, Veronal.

III. Eine dritte Gruppe umfaßt alle metallischen Gifte.

Nach dieser Einteilung der Gifte zerfällt auch die toxikologisch-chemische Analyse in drei Hauptabschnitte, von welchen ein jeder einen besonderen chemischen Untersuchungsgang erfordert. Einige Giftstoffe, wie die Mineralsäuren, die Ätzalkalien, das chlorsaure Kalium, die Oxalsäure lassen sich wegen ihres abweichenden Löslichkeitsverhaltens und ihrer sonstigen Eigenschaften nicht gut in eine dieser drei Hauptgruppen von Giften einreihen. Zur Prüfung auf derartige Gifte müssen gesonderte Proben des ursprünglichen Untersuchungsmaterials jeweils nach besonderen Verfahren für sich chemisch untersucht werden.

Irgend ein Untersuchungsmaterial, welches auf chemischem Wege auf einen etwaigen Giftgehalt untersucht werden soll, muß demnach in mindestens vier Teile geteilt werden, falls sich eine chemisch-toxikologische Untersuchung auf den Nachweis von allen bekannteren Giftstoffen zu erstrecken hat. Dieser Fall tritt beispielsweise ein, wenn Verdacht auf Ver-

giftung besteht, aber das Sektionsprotokoll und die Krankengeschichte der verstorbenen Person dem Chemiker keinerlei Anhaltspunkte für die chemische Untersuchung der in Frage kommenden Leichenteile auf einen etwaigen Giftgehalt liefern. Ein Teil des Untersuchungsmaterials dient dann für die Untersuchung auf solche giftig wirkende Stoffe, welche aus saurer Lösung mit Wasserdämpfen flüchtig sind (I) und gleichzeitig für die Untersuchung auf Gifte metallischen Ursprungs (III). Hat man nämlich die flüchtigen Stoffe abdestilliert, so kann der Rückstand, der im Destillationsgefäße bleibt, für die Untersuchung auf etwa vorhandene Metallgifte verwendet werden. Ein zweiter Teil wird auf organische Stoffe, wie auf Alkaloide, Glukoside, künstliche Arzneimittel untersucht (II) und ein dritter Teil dient für die Untersuchung der oben erwähnten Stoffe, die sich nicht gut in eine der drei Hauptgruppen der Gifte einreihen lassen. Endlich muß ein weiterer Teil der Untersuchungsobjekte als Reservematerial für eine Nachprüfung, falls eine solche nötig werden sollte, unter allen Umständen reserviert werden. Eine solche Nachprüfung oder Kontrolluntersuchung muß immer dann ausgeführt werden, wenn die Natur eines vermuteten Giftstoffes durch die erste Untersuchung nicht mit aller Sicherheit festgestellt wurde oder wenn ein erster Versuch verunglücken sollte.

Da sich die verschiedenen Gifte im tierischen Organismus ganz verschiedenartig verhalten, indem manche Gifte in bestimmten Organen, wie in der Leber zurückgehalten werden, andere aber in das Blut übergehen oder durch den Harn rasch zur Ausscheidung gelangen, so ergibt sich aus diesen Tatsachen, daß es in vielen Fällen zwecklos wäre, wenn man ein bestimmtes Organ auf alle etwa in Frage kommenden Gifte untersuchen wollte.

Ebenso wird es häufig vorkommen, daß man den im folgenden gegebenen allgemeinen, systematischen Untersuchungsgang auf Gifte nicht vollständig durchzuarbeiten hat, wie dies z. B. der Fall ist, wenn man bei einer chemisch-toxikologischen Untersuchung von vornherein nicht auf alle bekannteren Giftstoffe, sondern nur auf ein ganz bestimmtes Gift Rücksicht zu nehmen hat.

Im allgemeinen gilt als Regel, daß alle dem Gerichtschemiker gesondert eingelieferten Organe und tierischen Flüssigkeiten, wie Teile von Magen, Darm samt Inhalt, Stücke von Leber, Niere, Milz, ferner Blut und Harn, auch gesondert, also jeder Teil für sich, untersucht werden, und zwar auch dann, wenn die sämtlichen Leichenteile zu einer und derselben Untersuchungssache gehören. Von dieser Regel weicht man aber ab, wenn man in möglichst kurzer Zeit in Erfahrung bringen will, ob die fraglichen Teile einer Leiche überhaupt ein Gift enthalten oder nicht. Um diese Frage möglichst rasch beantworten zu können, entnimmt der Verfasser von den sämtlichen Leichenteilen, sowohl von den Organen wie von den Körperflüssigkeiten, je eine gute Durchschnittsprobe, mischt diese Proben und untersucht dieses Gemisch nach dem allgemeinen systematischen Untersuchungsgange auf einen etwaigen Giftgehalt. Erst wenn durch diese

orientierende Untersuchung ein bestimmter Giftstoff in den untersuchten Leichenteilen nachgewiesen ist, interessiert manchmal, aber nicht immer, auch die Frage, in welchen Organen oder Körperflüssigkeiten sich das nachgewiesene Gift vorfindet.

I. Die Untersuchung auf Phosphor und andere Giftstoffe, die aus saurer Lösung mit Wasserdämpfen flüchtig sind.

Bei toxikologisch-chemischen Untersuchungen ist ein Destillat, welches aus einem mit Weinsäure angesäuerten Gemisch erhalten wird, besonders auf die folgenden Stoffe zu untersuchen:

Phosphor,	Jodoform,
Blausäure,	Nitrobenzol,
Karbolsäure,	Anilin,
Chloroform,	Alkohol,
Chloralhydrat,	Schwefelkohlenstoff.

Die *Scherer*sche Vorprobe auf Phosphor.[1]) Vor der Destillation eines Untersuchungsobjektes führt man die von *Scherer* aufgefundene Vorprobe auf Phosphor aus, die auf der Wirkung des feuchten Phosphordampfes auf Silbernitrat beruht. Hierbei entsteht schwarzes Phosphorsilber neben metallischem Silber und Phosphorsäure, unter Umständen auch neben phosphoriger Säure.

Man bringt zu dem Zweck eine Probe des zerkleinerten Untersuchungsobjektes in ein Kölbchen, in dessen Mündung mit Hilfe eines nur lose aufsitzenden Stopfens zwei Streifen Filtrierpapier, von welchen der eine mit Silbernitratlösung, der andere mit Bleiazetatlösung[2]) befeuchtet ist, so befestigt sind, daß sie in den Kolbenhals frei hineinhängen. Nun erwärmt man das Kölbchen einige Minuten auf dem Wasserbade auf etwa 40—50°; färbt sich hierbei das Silber-, nicht aber das Bleipapier schwarz, so kann gelber Phosphor vorhanden sein. Werden aber beide Papierstreifen geschwärzt, so ist sicher Schwefelwasserstoff zugegen; selbstverständlich kann in diesem Falle neben Schwefelwasserstoff auch Phosphor vorhanden sein. Auch bei Abwesenheit von Schwefelwasserstoff braucht die Schwärzung des Silbernitratpapiers nicht unbedingt von Phosphordampf herrühren; sie kann auch durch irgendwelche andere reduzierend wirkende, flüchtige, organische Substanzen, wie Formaldehyd oder Ameisensäure, hervorgerufen sein.

Die *Scherer*sche Probe auf Phosphor hat also mehr den Wert einer empfindlichen Vorprobe auf Abwesenheit als auf Anwesenheit von freiem Phosphor; sie ist eine ausgezeichnete Orientierungsprobe, denn bleibt das

[1]) *Scherer*, Über die Erkennung und Bestimmung des Phosphors und der phosphorigen Säure bei Vergiftungen. Ann. d. Chemie **112**, 214 (1859).

[2]) Statt der Bleiazetatlösung kann zur Herstellung eines empfindlichen „Bleipapiers" auch eine alkalische Bleioxydlösung verwendet werden, wie sie durch Mischen einer Bleisalzlösung mit überschüssiger Natronlauge erhalten wird.

Silbernitratpapier bei dem Versuche unverändert, so ist gelber Phosphor in einem Untersuchungsmaterial höchstwahrscheinlich nicht vorhanden.

Destillation.

Ein Teil des ursprünglichen, vorher hinreichend zerkleinerten und gut gemischten Untersuchungsmaterials wird in einem geräumigen Glaskolben mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt, dann tropfenweise mit soviel wässeriger Weinsäurelösung versetzt, daß die ganze Mischung nach dem Umschütteln stark sauer reagiert. Liegen Leichenteile, wie Stücke von Magen und Darm samt deren Inhalt, oder Teile von Leber, Milz, Niere oder Gehirn für die Untersuchung auf flüchtige Gifte vor, so ist ein erheblicherer Zusatz von Wasser meist nicht notwendig, weil diese Organteile schon an und für sich ziemlich viel wässerige Flüssigkeit enthalten. Die betreffenden Leichenteile werden ebenfalls so gut als möglich zerkleinert, mit nur wenig Wasser angeschüttelt, dann mit wässeriger Weinsäurelösung oder verdünnter Schwefelsäure angesäuert und aus einem geräumigen Glaskolben der Destillation unterworfen.

Kann nach dem positiven Ausfall der *Scherer*schen Probe in einem Objekte Phosphor vorhanden sein, so wird die Destillation nach dem *Mitscherlich*schen Verfahren des Phosphornachweises ausgeführt. Hat aber die *Scherer*sche Probe zu einem negativen Resultate geführt, so destilliert man in der sonst üblichen Weise unter Anwendung eines schief liegenden *Liebig*schen Kühlers.

Die Destillation im *Mitscherlich*schen Apparate und der Nachweis des

Phosphors nach Mitscherlich.[1])

Das Verfahren des Phosphornachweises nach *Mitscherlich* beruht auf der Flüchtigkeit des gelben Phosphors, mit Wasserdämpfen und auf der Eigenschaft der phosphorhaltigen Wasserdämpfe in Berührung mit Luft in höchst charakteristischer Weise zu leuchten. Dieses Phosphorleuchten kann selbstverständlich nur in einem völlig verdunkelten Raume gut wahrgenommen werden.

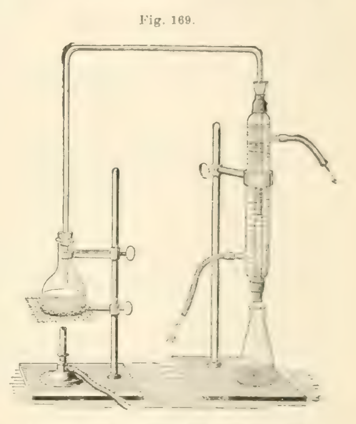
Ausführung. Man befestigt in der Öffnung des Destilliergefäßes mit Hilfe eines durchbohrten Stopfens ein zweimal knieförmig gebogenes, ziemlich langes und nicht zu enges Glasrohr, das an seinem anderen Ende mit einem senkrecht stehenden *Liebig*schen Kühler in Verbindung steht. (Vgl. Fig. 169.)

Das Destillationsgefäß soll höchstens zu einem Drittel seines Inhaltes mit der zu destillierenden Flüssigkeit gefüllt sein, weil sehr viele, zumal Eiweiß und Stärkemehl enthaltende Substanzen beim Destillieren in wässeriger Lösung stark schäumen und dadurch ein Übersteigen der destillierenden Masse in die Vorlage veranlassen können. Als Vorlage dient ein Kölb-

[1]) *E. Mitscherlich*, Methode zur Entdeckung des Phosphors bei Vergiftungen. Journ. f. prakt. Chemie. **66**. 238 (1855).

chen, das nur wenig Wasser, nämlich 3—5 cm^3, enthält, und in welches das Kühlrohr gerade eintaucht. Auf diese Weise vermeidet man jeden Verlust an den sehr leicht flüchtigen Giftstoffen Blausäure, Chloroform und Alkohol. Der Glaskolben wird auf einem dünnmaschigen Drahtnetze oder besser einer Asbestplatte unter ganz allmählichem Steigern der Temperatur bis zum Sieden seines Inhaltes erhitzt; ein zu rasches und zu starkes Erhitzen ist zu vermeiden, weil sonst die organische Substanz am Boden des Destillationsgefäßes leicht anbrennen und verkohlen könnte. Sobald die Flüssigkeit ins Sieden kommt, verdunkelt man das Zimmer und sieht zu, ob in der zweimal knieförmig gebogenen Glasröhre oder dem Kühlrohr des *Mitscherlich*schen Apparates ein Phosphorleuchten wahrzunehmen ist. Tritt dasselbe deutlich auf, so ist im Untersuchungsobjekt bestimmt giftiger, gelber Phosphor vorhanden. Das Leuchten während der Destillation mit Wasserdämpfen ist für die giftige Modifikation des Phosphors äußerst charakteristisch und auch oftmals das einzig sichere, unanfechtbare Erkennungsmittel von Phosphor!

Fig. 169.



Apparat zum Nachweis des Phosphors nach *Mitscherlich*.

Zeigt sich die Phosphoreszenzerscheinung, die auf nichts anderes als auf einen Oxydationsvorgang zurückzuführen ist und auf der Bildung von phosphoriger Säure aus dem Phosphordampf beruht, bei der Destillation nicht sofort, so unterbreche man die Destillation nicht allzufrühe, da verschiedene etwa vorhandene Substanzen, wie Alkohol, Äther, Terpentinöl und verschiedene andere ätherische Öle das Phosphorleuchten entweder vollständig verhindern oder wenigstens stark beeinträchtigen können. Auch bei Anwesenheit von viel Karbolsäure, Kreosot, Chloroform, Chloralhydrat oder Schwefelwasserstoff kann das Phosphorleuchten völlig ausbleiben. Auch Quecksilberchlorid und andere Quecksilberverbindungen können das Phosphorleuchten verhindern.[1] Höchstwahrscheinlich wird das von den Wasserdämpfen fortgeführte Quecksilberchlorid durch die Phosphordämpfe zu Quecksilber reduziert, das sich in einem solchen Falle auch im aufgesammelten Destillate vorfindet. Für die Annahme einer Wechselwirkung zwischen den Dämpfen des Phosphors und des Quecksilberchlorids spricht auch die Tatsache, daß im Destillate neben metallischem Queck-

[1]) *K. Polstorff* und *J. Mensching*, Über die Prüfung auf Phosphor nach *Mitscherlichs* Verfahren bei Anwesenheit von Quecksilberchloriden. Ber. d. Deutschen chem. Ges. 19, 1763 (1886).

silber auch Phosphorsäure nachweisbar ist. Sind derartige Stoffe, welche auf die Phosphoreszenzerscheinungen einen störenden Einfluß ausüben können, zugegen, so tritt in manchen, aber nicht allen Fällen noch nachträglich das Phosphorleuchten ein, wenn man längere Zeit destilliert. In allen Fällen verdampfe man, auch wenn ein Phosphorleuchten nicht aufgetreten ist, einen Teil des aufgesammelten Destillats, das bei Anwesenheit von Phosphor stark nach diesem riecht und das neben phosphoriger Säure auch Phosphorkügelchen enthalten kann, mit viel gesättigtem Chlorwasser oder mit wenig rauchender Salpetersäure in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade, löse den Rückstand in wenig Wasser und prüfe die Lösung mit Molybdatreagens und mit Magnesiamischung auf Phosphorsäure.

Bemerkungen: Alle die Stoffe, welche den Nachweis des freien Phosphors nach *Mitscherlich* mehr oder weniger stören, machen ihn nach *A. Fischer*[1]) meist nicht ganz unmöglich, wenn man nach der *Hilger-Nattermann*schen Modifikation[2]) des *Mitscherlich*schen Verfahrens arbeitet. Diese Modifikation besteht darin, daß man die phosphorhaltigen Wasserdämpfe in die Luft austreten respektive Luft in den Apparat treten läßt.

Der Nachweis des Phosphors und der phosphorigen Säure nach Blondlot[3]) und Dusart.[4])

Hat man nach *Mitscherlichs* Verfahren Phosphor nicht nachweisen können, so ist es in vielen Fällen angezeigt, ein Untersuchungsmaterial auf das erste Oxydationsprodukt des Phosphors, die phosphorige Säure, zu welcher ja der gelbe Phosphor leicht oxydiert wird, zu untersuchen. Die geringsten Mengen von phosphoriger, wie auch von unterphosphoriger Säure werden nach dem Verfahren von *Blondlot* und *Dusart* aufgefunden. Diese Methode beruht auf der Bildung von Phosphorwasserstoff (PH_3) bei der Einwirkung von naszierendem Wasserstoff auf gelben Phosphor; auch die phosphorige und unterphosphorige Säure, nicht aber die gewöhnliche Phosphorsäure, werden unter den gleichen Bedingungen, nämlich beim Erwärmen mit Zink und verdünnter Schwefelsäure, zu Phosphorwasserstoff reduziert.

Phosphorwasserstoff sowie Phosphor enthaltender Wasserstoff verbrennen beim Entzünden an der Luft mit höchst charakteristischer grüner Flamme: *Dusart*sche Phosphorreaktion. Die grüne Färbung der Flamme ist besonders dann gut zu erkennen, wenn man eine kalte Porzellanschale in die Flamme hält und den Versuch in einem verdunkelten Raume vornimmt.

Da es sich bei toxikologischen Untersuchungen meist um den Nachweis von sehr geringen Mengen von giftigem Phosphor handelt, untersucht man den aus einem Untersuchungsmaterial kommenden Wasserstoff

[1]) *A. Fischer*, Beiträge zum Phosphornachweis. *Pflügers* Archiv. Bd. **97**. 578 (1903).

[2]) Forschungsbericht über Lebensmittel und ihre Beziehungen zur Hygiene etc. 4. 241 (1897).

[3]) *Blondlot*, Sur la recherche toxicologique du phosphore par la coloration de la flamme. Compt. rend. 52. 1197 (1861).

[4]) *Dusart*, Note sur la recherche du phosphore. Comptes rend. T. **43**. 1126 (1856).

nicht direkt auf einen etwaigen Phosphorgehalt, sondern leitet ihn zunächst in eine verdünnte Silbernitratlösung, aus welcher Phosphorwasserstoff wie auch gelber Phosphor schwarzes Phosphorsilber fällen:

$$PH_3 + 3\,NO_3Ag = Ag_3P + 3\,HNO_3.$$

Auf diese Weise lassen sich noch Spuren von gelbem Phosphor, die etwa in Leichenteilen enthalten sind, in dem mit Silbernitrat entstehenden Niederschlage konzentrieren. Naszierender Wasserstoff, also Zink in Verbindung mit verdünnter Schwefelsäure, machen dann aus dem schwarzen Phosphorsilberniederschlag wieder Phosphorwasserstoff frei:

$$Ag_3P + 3\,H = PH_3 + 3\,Ag.$$

Der Nachweis des giftigen Phosphors nach dem Verfahren von *Dusart-Blondlot* zerfällt also in zwei, getrennt voneinander auszuführende Operationen:

1. In die Herstellung des Phosphorsilberniederschlages.
2. In die Prüfung des fraglichen Silberniederschlages im Apparate von *Dusart*.

Bemerkungen. Ein schwarzer oder brauner Niederschlag, der sich beim Einleiten des fraglichen Wasserstoffgases in die Silbernitratlösung bildet, ist selbstverständlich noch kein Beweis für die Anwesenheit von Phosphor, da auch andere Substanzen, wie Schwefelwasserstoff, Arsenwasserstoff, Antimonwasserstoff, sowie reduzierend wirkende organische Stoffe mit verdünnter Silbernitratlösung ebenfalls schwarze Fällungen geben. Ein erhaltener schwarzer Silberniederschlag muß daher unter allen Umständen mit Hilfe der *Dusart*schen Reaktion auf einen etwaigen Gehalt an Phosphor untersucht werden.

Ausführung.

1. Die Herstellung des Phosphorsilberniederschlages.
(Überführung des Phosphors in Phosphorsilber.)

Man bringt das möglichst zerkleinerte, mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührte Untersuchungsobjekt oder, falls nur auf phosphorige Säure (siehe weiter unten) geprüft werden soll, den wässerigen, filtrierten Auszug des Untersuchungsobjektes oder aber das Filtrat vom Rückstande der Destillation nach dem Verfahren von *Mitscherlich* in eine geräumige Gasentwicklungsflasche, in der man aus phosphorfreiem Zink und reiner verdünnter Schwefelsäure (1 : 5) Wasserstoff entwickelt. Man läßt den naszierenden Wasserstoff längere Zeit, 1½—3 Stunden und länger, auf das Untersuchungsmaterial einwirken und leitet den entweichenden Wasserstoff in eine neutrale Silbernitratlösung, die sich in einer Vorlage befindet. Enthält das Untersuchungsmaterial giftigen Phosphor, so entweicht ein phosphor- und phosphorwasserstoffhaltiger Wasserstoff, der in der vorgelegten Silbernitratlösung einen schwarzen Niederschlag von Phosphorsilber erzeugt. Dieser wird dann auf einem aschefreien Filterchen gesammelt, mit wenig kaltem Wasser ausgewaschen und nach den unten gemachten Angaben im *Dusart*schen Apparate untersucht.

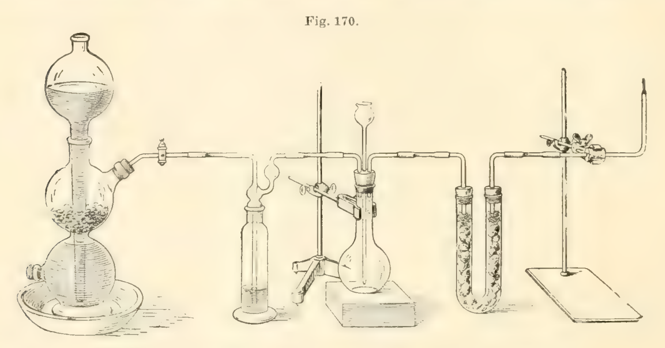
Besteht der erhaltene Silberniederschlag zum Teil oder ganz aus Phosphorsilber, so enthält die von ihm abfiltrierte klare Flüssigkeit

Phosphorsäure oder phosphorige Säure. Um diese Säuren nachzuweisen, fällt man aus der abfiltrierten Lösung erst mit Salzsäure das überschüssige Silber vollständig aus, filtriert das gefällte Chlorsilber durch ein vorher mit Säure und Wasser gut ausgewaschenes Filter, verjagt aus dem Filtrate die Salzsäure vollständig durch Abdampfen mit starker Salpetersäure auf dem Wasserbade und prüft schließlich den in wenig warmem Wasser aufgelösten Verdampfungsrückstand mit Molybdatreagens oder mit Magnesiamischung auf Phosphorsäure.

2. Die Prüfung des fraglichen Silberniederschlages auf einen Gehalt an Phosphorsilber in dem Apparate von *A. Hilger* und *H. Nattermann.*[1] (Fig. 170.)

Eine Kochflasche von ca. 100 cm^3 Inhalt wird mit einem dreifach durchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch zwei dieser Öffnungen gehen rechtwinklig gebogene Glasröhren, welche beide unmittelbar unter

Fig. 170.



Apparat von *Dusart-Hilger-Nattermann* zum Nachweis von Phosphor.

dem Stopfen endigen. Durch die eine Röhre wird Wasserstoff, der in einem *Kipp*schen Apparate aus Zink und verdünnter Schwefelsäure, nicht Salzsäure, bereitet wird, eingeleitet und der durch die andere Glasröhre das Kölbchen wieder verläßt. An dieses schließt sich ein **U**-Rohr an, welches mit konzentrierter Kalilauge getränkte Bimssteinstückchen enthält, die etwa vorhandenen Schwefelwasserstoff absorbieren sollen; andrerseits steht das **U**-Rohr in Verbindung mit einem Glasrohr aus Kaliglas, das mit einer Platinspitze versehen ist.[2] Durch die dritte Öffnung des Stopfens

[1] Forschungsbericht über Lebensmittel und ihre Beziehungen zur Hygiene etc. **4**. 241—258 (1897).

[2] *Hilger* und *Nattermann* nehmen an Stelle der Glasröhre mit Platinspitze ein von einer Gabel getragenes Lötrohr, das ebenfalls mit einer Platinspitze versehen ist; unterhalb der letzteren wird das Lötrohr mit Watte umwickelt, die naß gehalten wird und so als Kühler wirkt.

führt eine Trichterröhre bis auf den Boden des Gefäßes. Das Filter, auf dem sich der auf Phosphor zu prüfende Silberniederschlag befindet, wird zerschnitten und in die Kochflasche gebracht. Diese enthält einige Stückchen phosphorfreies Zink und so viel Wasser, daß der Zutritt der äußeren Luft durch das Trichterrohr abgeschnitten ist. Nun leitet man durch den Apparat Wasserstoff, entzündet den letzteren mit der nötigen Vorsicht und überzeugt sich in der oben angegebenen Weise davon, ob die Flamme vollkommen farblos ist, ob sie nämlich bei der Beobachtung im verdunkelten Raume ohne grünen Flammenkegel und ohne grünes Leuchten brennt.[1]) Nach *Hilger* und *Nattermann* überzeugt man sich von der Brauchbarkeit des Zinks am besten in der Weise, daß man die Wasserstoffflamme im Spektralapparate untersucht. Ganz reines Zink liefert mit reiner Schwefelsäure einen Wasserstoff, dessen Spektrum nur eine orangerote Linie an Stelle der gelben Natriumlinie zeigt; diese Linie ist freilich nicht immer sichtbar. Die geringsten Spuren Phosphor geben sich durch drei grüne Linien zu erkennen, die rechts von der Linie D liegen; zwei dieser drei Linien sind stärker gefärbt als die dritte. Hat man sich auf diese Weise von der Reinheit des Zinks und der Schwefelsäure überzeugt, so gießt man durch das Trichterrohr einige Kubikzentimeter verdünnte Schwefelsäure (1 : 5) in die Kochflasche zum Zink und dem fraglichen Silberniederschlag. Ist der Niederschlag phosphorhaltig, so tritt, manchmal erst nach geraumer Zeit, eine Grünfärbung der Flamme auf, deren Spektrum zweckmäßigerweise untersucht wird.

Für die Untersuchung auf Phosphor nach dem Verfahren von *Blondlot-Dusart* eignet sich auch das nach dem *Mitscherlich*schen Verfahren erhaltene Destillat. Erhält man mit demselben eine Grünfärbung der Wasserstoffflamme, so enthält das Untersuchungsobjekt Phosphor.

Bemerkungen. Trotz der außerordentlich großen Empfindlichkeit des zuletzt beschriebenen Phosphornachweises neigen viele Gerichtschemiker dahin, daß das *Blondlot-Dusart*sche Verfahren nicht als Ersatz des *Mitscherlich*schen Verfahrens angesehen werden könne. Nach *Selmi* sollen nämlich solche faulende, in Verwesung begriffene Leichenteile, die wie das Gehirn phosphorhaltige organische Verbindungen enthalten, ein Destillat liefern können, das mit Silbernitrat einen schwarzen Niederschlag bildet, der die *Dusart*sche Reaktion gibt. *Z. Halász*[2]) ist freilich bei seinen Unternehmungen zu anderen Resultaten gekommen wie *Selmi*. Derselbe hat menschliche Gehirne, Kalbs- und Schweinsgehirne, schließlich Gehirne und andere Organe von Kaninchen, welche durch Phosphor auf verschiedene Weise, per os oder subkutan, vergiftet worden waren, erst frisch, dann von Woche zu Woche nach mehr oder weniger intensivem Faulen unter verschiedenen Umständen nach *Blondlot-Dusart* untersucht. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von *Selmi* war Phosphor bei diesen Untersuchungen in den Gehirnen in keinem Falle nachweisbar. Diese Ergebnisse der Experimente von *Halász* widerlegen somit die frühere Annahme, daß während des Verlaufes der Fäulnis der normale Phosphorgehalt des Gehirnes eine derartige Umwandlung erfahren könne, daß er durch die *Blondlot-Dusart*sche Reaktion nachzuweisen

[1]) Es ist nicht leicht, ein metallisches Zink zu beziehen, das diese Probe aushält, das also absolut phosphorfrei ist!

[2]) *Z. Halász*, Ist das *Blondlot-Dusart*sche Verfahren in gerichtlich-chemischen Fällen verläßlich? Zeitschr. f. anorgan. Chemie. **26**. 438 (1900).

wäre. Aber auch nach erfolgter Vergiftung der Kaninchen durch Phosphor konnte im Gehirn dieser Tiere Phosphor nicht nachgewiesen werden, hingegen in anderen Organen der vergifteten Tiere, wie im Magen und in den Eingeweiden, außerdem in der Leber, der Lunge und in den Nieren, also in blutreichen Organen; überall da, wohin der Phosphor direkt gelangt oder indirekt aufgesaugt wird, konnte Phosphor in geringeren oder größeren Mengen immer aufgefunden werden. *Halász* zieht aus seinen Versuchsergebnissen den Schluß, daß, falls in der Gehirnmasse bei der Fäulnis überhaupt eine phosphorhaltige Verbindung entsteht, diese dann mit Wasserdämpfen nicht destillierbar ist und auch die *Blondlot-Dusart*sche Reaktion nicht gibt. *Halász* ist auf Grund seiner Versuchsergebnisse zu dem Schlusse gekommen, daß das *Blondlot-Dusart*sche Verfahren des Phosphornachweises für gerichtlich-chemische Fälle geradeso verläßlich ist wie das Verfahren von *Mitscherlich*.

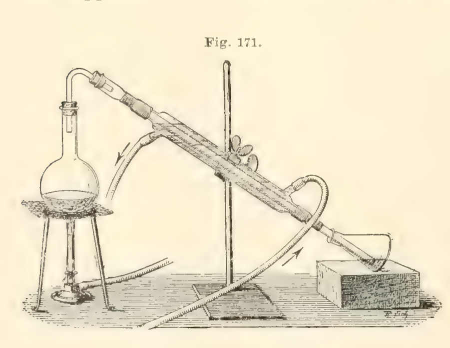
Nachweis der phosphorigen Säure in Leichenteilen.

Die Reduktion der phosphorigen Säure durch Zink und verdünnte Schwefelsäure zu Phosphorwasserstoff geht außerordentlich langsam vor sich. Selbst die Gegenwart von nur wenigen Milligrammen phosphoriger Säure erfordert nach *Hilger* und *Nattermann* (l. c.) eine zehn- bis vierzehntägige Einwirkung! Ferner muß berücksichtigt werden, daß Phosphorsilber Ag_3P sehr wenig beständig ist, indem es in Berührung mit Wasser innerhalb kurzer Zeit in Silber und phosphorige Säure zerfällt, die dann durch die vorhandene Salpetersäure zu Phosphorsäure oxydiert wird. Hat man bei einer toxikologischen Untersuchung speziell auf phosphorige Säure Rücksicht zu nehmen, so empfehlen *Hilger* und *Nattermann* die Untersuchung des entstandenen Silberniederschlages (eventuell Ag_3P) auf einen etwaigen Phosphorgehalt nach *Dusart* sowie diejenige der abfiltrierten Lösung auf Phosphorsäure (siehe oben), schon nach zwei, spätestens nach drei Tagen vorzunehmen.

Die übliche Destillation mit schief liegendem Kühler.

Hat man das Phosphorleuchten bei der Destillation im *Mitscherlich*schen Apparate deutlich wahrgenommen, so kann man entweder in diesem Apparate weiter destillieren, oder aber man unterbricht die Destillation und führt sie in der üblichen Weise mit schief gestelltem *Liebig*schen Kühler (Fig. 171) zu Ende. Ebenso destilliert man stets in dieser einfachen Weise, wenn die *Scherer*sche Vorprobe zu einem negativen Resultate geführt hat oder die Prüfung eines Untersuchungsobjektes auf Phosphor aus bestimmten Gründen unnötig ist.

Fig. 171.



Einfacher Destillationsapparat.

Da die verschiedenen in Betracht kommenden Giftstoffe nicht in gleichem Grade mit Wasserdämpfen flüchtig sind, sammelt man das Destillat zweckmäßig in zwei oder drei Fraktionen auf. Die erste Fraktion

enthält dann bei weitem den größten Teil der leicht flüchtigen Giftstoffe, also fast alle, ursprünglich in einem Untersuchungsobjekte vorhanden gewesene Blausäure, ferner Chloroform, Alkohol, Jodoform und Nitrobenzol. Die weiteren Fraktionen können noch beträchtliche Mengen von denjenigen Stoffen enthalten, welche wie Karbolsäure, Anilin, Chloralhydrat und Schwefelkohlenstoff mit Wasserdämpfen weniger leicht flüchtig sind und die daher nur langsam abdestillieren. Es soll selbstverständlich damit nicht gesagt sein, daß das zuerst aufgesammelte Destillat von den zuletzt aufgeführten, nicht so leicht flüchtigen Stoffen überhaupt nichts enthalten kann. Umgekehrt können sich auch in den weiteren Fraktionen noch geringe Mengen der mit Wasserdämpfen leicht übergehenden Stoffe vorfinden.

Man arbeitet daher zweckmäßig in der Weise, daß man zunächst nur 5—10 *cm*³ Flüssigkeit abdestilliert und dieses erste Destillat in einzelnen Proben auf Blausäure, Chloroform und Alkohol, eventuell auch auf Jodoform und Nitrobenzol untersucht. Alsdann destilliert man weitere 10—20 *cm*³ ab und verwendet dieses Destillat für die Untersuchung auf Karbolsäure, Lysol, Anilin, Chloralhydrat und Schwefelkohlenstoff.

Verschiedene der mit Wasserdämpfen flüchtigen Giftstoffe lassen sich, sowohl im ursprünglichen Untersuchungsobjekte, als auch besonders im Destillate an ihrem charakteristischen Geruche mit großer Sicherheit erkennen, wie Karbolsäure, Nitrobenzol, Alkohol, Chloroform, Jodoform und auch Blausäure, falls mehr als Spuren derselben vorhanden sind. Die erhaltenen Destillate untersucht man zunächst mit je einer, und zwar der empfindlichsten Probe auf ein jedes der in Betracht kommenden Gifte. Mit Hilfe der Berlinerblau- oder Rhodanreaktion prüft man das Destillat auf Blausäure, mit dem *Millon*schen Reagens auf Karbolsäure und Anilin, mit Jod und Kalilauge auf Alkohol, Azeton, Azetaldehyd, mit Anilin und Kalilauge, also mittelst der Isonitrilprobe, auf Chloroform, Jodoform sowie auf Chloralhydrat und schließlich mit Bleiazetat und Kalilauge auf Schwefelkohlenstoff. Glaubt man ein flüchtiges Gift gefunden zu haben, so sucht man die Richtigkeit des erst erhaltenen Resultates durch eine zweite und dritte Identitätsreaktion weiterhin zu bestätigen. Man führe aber nur solche Reaktionen aus, welche für das vermutete Gift charakteristisch sind.

In sehr vielen Fällen wird man von vornherein nicht auf alle Giftstoffe, die sich in einem Destillate vorfinden können, zu prüfen haben.

Blausäure.

Für die chemische Untersuchung auf Blausäure und einfache Cyanmetalle wie Cyankalium müssen der Leiche in erster Linie Magen- und Darminhalt, ferner blutreiche Organe, wie Leber, Gehirn und Herz sowie Blut und unter Umständen auch Harn entnommen werden. Die in Frage kommenden Leichenteile müssen ohne Verzug auf einen etwaigen Blausäuregehalt untersucht werden. Falls die Leichen-

teile nicht schon stark in Verwesung übergegangen sind, wird sich vorhandene Blausäure schon an ihrem charakteristischen Geruche zu erkennen geben.

Vorprobe auf Blausäure nach *Schönbein-Pagenstecher.* Vor der Destillation führe man die folgende Vorprobe auf Blausäure aus. Man bringt eine Probe des Untersuchungsmaterials in ein Kölbchen, fügt Weinsäurelösung bis zur sauren Reaktion hinzu und befestigt mit Hilfe eines Stopfens einen „Guajakharz-Kupfersulfat-Papierstreifen" [1]) so, daß er im Kölbchen frei aufgehängt ist. Nun erhitzt man das Kölbchen auf dem Wasserbade gelinde. Färbt sich der Papierstreifen nicht blau oder blaugrün, so ist Blausäure oder Cyankalium auch nicht vorhanden. Tritt aber andrerseits eine Blaufärbung des Streifens ein, so kann Blausäure oder ein leicht zersetzliches Cyanid zugegen sein. Weitere Schlüsse können aus dem positiven Ausfall der Reaktion nicht gezogen werden, da außer Blausäure auch andere Stoffe, wie Ammoniak, flüchtige Ammoniakverbindungen, Salzsäure und besonders Oxydationsmittel, wie Ozon, Salpetersäure und Chlordämpfe, den Guajakharz-Kupfersulfat-Papierstreifen unter Umständen ebenfalls blau färben. Die sehr empfindliche *Schönbein-Pagenstecher*sche Reaktion kann also für sich allein niemals beweisend sein für die Gegenwart von Blausäure.

Für die eigentliche chemische Untersuchung auf Blausäure muß das zerkleinerte Untersuchungsmaterial, nach dem Anrühren mit weinsäurehaltigem Wasser, nach den Angaben von *Schönbein* der Destillation unterworfen werden. Da Blausäure mit den Wasserdämpfen leicht übergeht, findet sich bei weitem die größte Menge des Giftes in dem zuerst übergegangenen Destillate vor. Man verwende daher für den Nachweis der Blausäure die ersten 5 oder 10 cm^3 Destillat, die sich in der Vorlage angesammelt haben. Zum sicheren Nachweis der Blausäure, die sich häufig im Destillate schon durch ihren Geruch zu erkennen gibt, dienen die folgenden Proben:

1. Berlinerblaureaktion. Man versetzt die auf Blausäure zu untersuchende Flüssigkeit, also eine Probe des Destillats, erst mit wenig Kalilauge, dann mit 1 oder 2 Tropfen frisch bereiteter Eisenvitriollösung sowie mit 1 Tropfen Eisenchloridlösung, schüttelt gut durch und erwärmt gelinde; alsdann säuert man das Gemisch mit verdünnter Salzsäure an. Sind erheblichere Mengen von Blausäure vorhanden, so entsteht sofort ein blauer Niederschlag von Berlinerblau; bei Gegenwart von sehr wenig Blausäure erhält man zunächst eine blau, blaugrün oder grünblau gefärbte Lösung, aus der sich erst bei längerem Stehen, oftmals erst nach 10 bis

[1]) Man erhält solches „Guajakharz-Kupfersulfatpapier", wenn man schmale Streifen Filtrierpapier erst mit frisch hergestellter alkoholischer Guajaktinktur (1 : 10) tränkt, dann diese Streifen zum oberflächlichen Austrocknen einige Male hin und her bewegt und dieselben schließlich mit einer sehr verdünnten Kupfersulfatlösung von 1 : 1000 befeuchtet.

12 Stunden, einige Flocken von Berlinerblau abscheiden. Empfindlichkeit der Probe: 1 : 5000000.[1])

2. Rhodanreaktion. Eine weitere Probe des erhaltenen Destillats versetzt man mit einigen Tropfen Kalilauge und wenig gelbem Schwefelammonium, dampft dieses Gemisch in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade zur Trockene ein, nimmt den Verdunstungsrückstand in wenig Wasser auf, säuert mit verdünnter Salzsäure an, filtriert den ausgeschiedenen Schwefel durch ein Doppelfilterchen ab und versetzt das möglichst klare Filtrat mit 2—3 Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung. Bei Vorhandensein von Blausäure im untersuchten Destillat färbt sich jetzt die Flüssigkeit durch entstandenes Ferrirhodanid blutrot oder aber nur rötlich, falls es sich um Spuren von Blausäure handelt. Empfindlichkeit: 1 : 4000000.

3. Nitroprussidreaktion von *Vortmann*.[2]) Man versetzt eine Probe des Destillats mit einigen Tropfen Kaliumnitritlösung, 2—4 Tropfen Eisenchloridlösung und mit so viel verdünnter Schwefelsäure, daß die ursprünglich gelbbraune Färbung gerade in Hellgelb übergeht. Nun erhitzt man das Gemisch zum Sieden, fällt das überschüssige Eisen mit Ammoniak im geringen Überschusse aus, filtriert ab und versetzt das Filtrat mit 2 Tröpfchen stark verdünntem Schwefelammonium; tritt jetzt eine violette, bald in Blau, Grün und Gelb übergehende Färbung des Filtrats ein, so hat das untersuchte Filtrat Blausäure enthalten. Empfindlichkeit: 1 : 312000.

Bemerkungen. Diese Blausäureprobe ist die Umkehrung der Nitroprussidreaktion auf Schwefelwasserstoff, indem nämlich unter den oben angegebenen Bedingungen im Destillate vorhandene Blausäure in Nitroprussidkalium, $Fe(CN)_5(NO)K_2$, übergeführt wird, das mit Schwefelammonium die bekannten Färbungen gibt. Sehr geringe Mengen Blausäure liefern nur eine bläulichgrüne bis grünlichgelbe Färbung.

4. Silberreaktion. Das in Frage kommende Destillat wird erst mit verdünnter Salpetersäure angesäuert, dann mit Silbernitrat im Überschusse versetzt; entsteht ein weißer, käsiger, in Ammoniak leicht löslicher Niederschlag (AgCN), so ist höchstwahrscheinlich Blausäure im Destillate vorhanden. Empfindlichkeit: 1 : 250.000. — Eine Verwechslung der Blausäure mit Salzsäure ist ausgeschlossen, falls eine sehr stark verdünnte Lösung destilliert wurde, unter welchen Bedingungen freie Salzsäure nicht überdestilliert. Will man von vornherein jede Spur von etwa vorhandener freier Salzsäure ausschließen, so destilliert man das erhaltene Destillat noch einmal über Borax, welcher die freie Salzsäure bindet, nicht aber die Blausäure, die also mit den Wasserdämpfen übergeht. — Der mit Silbernitrat erhaltene Niederschlag kann zu seiner Identifizierung, nach dem Abfiltrieren, Auswaschen und Trocknen, in einem Röhrchen geglüht werden; Cyansilber zerfällt hierbei in Silber und Dicyan, von welchen das letztere an seinem charakteristischen Geruch erkannt wird:

$$2\,AgCN = 2\,Ag + (CN)_2.$$

---

[1]) Nach *Link* und *Mockel*, Zeitschr. f. analyt. Chemie. 17. 455 (1878).

[2]) *G. Vortmann*, Eine neue Reaktion zur Nachweisung geringer Mengen Blausäure. Monatshefte für Chemie. 7. 416 (1886).

Quantitative Bestimmung der Blausäure.

Man unterwirft eine abgewogene Menge des Untersuchungsmaterials, nach dem Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure oder Weinsäure, der Destillation und ermittelt den Blausäuregehalt des erhaltenen Destillats gewichts- oder maßanalytisch. Im ersteren Fall wird das aus dem Destillate mit Silbernitrat gefällte Silbercyanid entweder auf einem bei 100° getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, ausgewaschen und bei 100° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. oder es wird durch stärkeres Glühen im gewogenen Porzellantiegel in metallisches Silber übergeführt und dieses gewogen. Sollte Salzsäure mit übergegangen sein, so wird das Destillat nochmals über Borax destilliert, welcher die Mineralsäure, nicht aber die Blausäure, zurückhält, so daß jetzt sicher ein salzsäurefreies Destillat erhalten wird.

Nachweis der Blausäure neben Blutlaugensalz.

Enthält ein Untersuchungsobjekt das nicht giftige gelbe Blutlaugensalz, so findet sich bei der Destillation aus weinsaurer Lösung Blausäure im Destillate vor. Bei einem Versuche mit einer 1%igen Blutlaugensalzlösung bei Gegenwart von nur 0·03 *g* Weinsäure gingen reichliche Mengen Blausäure ins Destillat über. Auch beim Einleiten von Kohlensäure in die wässerige heiße Lösung des gelben Blutlaugensalzes wird, schon bei Wasserbadtemperatur (bei 75°), Blausäure frei. Um zunächst auf Blutlaugensalz zu prüfen, wird ein Teil des mit Wasser angerührten ursprünglichen Untersuchungsobjektes abfiltriert und das Filtrat mit Ferrichloridlösung und Salzsäure versetzt; entsteht hierbei ein Niederschlag von Berlinerblau, so ist Blutlaugensalz vorhanden. Um neben Blutlaugensalz unzweideutig freie Blausäure, respektive Kalium- oder Natriumcyanid [1]) nachzuweisen, destilliert man das Untersuchungsobjekt mit nicht zu wenig Natriumkarbonat; hierbei wird, selbst bei längerer Destillation, über freiem Feuer nur Blausäure aus den einfachen Cyaniden, nicht aber aus Blutlaugensalz frei!

Nachweis von Quecksilbercyanid.

Das stark giftige Quecksilbercyanid liefert bei der Destillation aus weinsaurer Lösung, nur bei Vorhandensein größerer Mengen des Cyanids, ein blausäurehaltiges Destillat; z. B. gibt hierbei das Destillat aus 100 cm^3 einer 1%igen Quecksilbercyanidlösung deutliche Berlinerblaureaktion. Liegen jedoch nur geringe Mengen des Cyanids in stark verdünnter Lösung vor (z. B. 100 cm^3 einer 0·01%igen Lösung), so geht, selbst bei der Destillation aus stark weinsaurer Flüssigkeit, keine Spur Blausäure über; fügt man aber einige Kubikzentimeter frisches Schwefelwasserstoffwasser hinzu und destilliert von neuem, so tritt eine vollständige Zersetzung des Quecksilbercyanids ein und das Destillat enthält Blausäure.

Nachweis von Quecksilbercyanid neben Blutlaugensalz.

Der oben angegebene Nachweis der Blausäure aus den einfachen Cyaniden neben Blutlaugensalz läßt sich nicht für das Quecksilbercyanid anwenden, da aus diesem bei der Destillation, selbst in gesättigter Natriumkarbonatlösung und bei längerem Kochen, keine Spur Blausäure frei wird. Destilliert man aber bei Gegenwart von nicht zu wenig Natriumbikarbonat und einigen Kubikzentimetern frisch be-

---

[1]) Nicht aber Quecksilbercyanid.

reiteten, starken Schwefelwasserstoffwassers, so wird nur aus dem Quecksilbercyanid, nicht aber aus dem Blutlaugensalz Blausäure frei. Auf diese Weise läßt sich die Blausäure von ganz kleinen Mengen Quecksilbercyanid neben viel Blutlaugensalz bestimmt nachweisen, z. B. 0·01 *g* $Hg(CN)_2$ in 100 *cm*³ einer 10%igen Blutlaugensalzlösung. Bei der direkten Destillation von gelbem Blutlaugensalz mit Schwefelwasserstoffwasser, also ohne Zusatz von Natriumbikarbonat, gehen reichliche Mengen von Blausäure ins Destillat über.

Karbolsäure.

Die Karbolsäure, $C_6H_5.OH$, übt im konzentrierten Zustande auf die Bestandteile des menschlichen Körpers, insbesondere auf Eiweiß und Protoplasmagebilde, eine koagulierende und abtötende Wirkung aus. Sie ist daher ein Ätzmittel von bedeutender Stärke. Außer dieser lokalen Wirkung kommen ihr auch resorptive Wirkungen zu, und zwar äußert sie besonders Affinitäten zum Zentralnervensystem, zum Gehirn und Rückenmark, die sich bei Tieren zuerst als heftige Reizung, Steigerung der Erregbarkeit, wie bei Strychnin, dann durch Lähmung zu erkennen geben. Beim Menschen tritt das Reizungsstadium meist sehr zurück. Bei chronischer Vergiftung durch mehrfache Applikation kleinerer Dosen Karbolsäure äußern sich die resorptiven Wirkungen auch in Degeneration der Niere und Leber. Karbolsäure wird vom menschlichen Organismus sehr rasch resorbiert, und zwar geht die Resorption von der äußeren Haut, vom Magendarmkanal, von Wunden und von den Respirationsorganen aus gut vor sich. Sie geht im menschlichen Organismus durch Paarung mit saurem schwefelsaurem Kalium in phenolschwefelsaures Kalium:

$$KO-SO_2-OH + HO-C_6H_5 = H_2O + KO-SO_2-OC_6H_5$$

und, falls größere Mengen Phenol einverleibt wurden, durch Paarung mit Glukuronsäure, $HOOC.(CH.OH)_4.CHO$, auch in Phenolglukuronsäure über. Ein wesentlicher Teil der Karbolsäure wird innerhalb des Organismus zu den Dioxybenzolen Brenzkatechin, $C_6H_4(OH)_2$, (1·2) und Hydrochinon, $C_6H_4(OH)_2$, (1·4) oxydiert, die dann ebenfalls eine Synthese mit Schwefelsäure eingehen und als ätherschwefelsaure Salze im Harn erscheinen. Durch die weitere Oxydation des Hydrochinons zu gefärbten Produkten (Chinon?) ist die meist dunkle Färbung des „Karbolharns" bedingt. Manchmal ist bei Karbolvergiftung schon der frisch gelassene Harn stark dunkel, nämlich dunkelgrün bis schwarz gefärbt, in anderen Fällen erscheint der Harn zunächst bernsteingelb und färbt sich erst beim Stehen an der Luft immer stärker. Liegt Verdacht auf eine Vergiftung mit Karbolsäure vor, so muß demnach auch der Harn der betreffenden Person chemisch untersucht werden. Ein „Karbolharn" ist, im Gegensatz zum normalen menschlichen Harn, fast frei von „Sulfatschwefelsäure"[1], die auch präformierte Schwefelsäure genannt wird, und gibt daher, mit überschüssiger Essigsäure und mit Baryumchlorid versetzt, keinen oder nur

[1]) Das ist die in Form von schwefelsauren Salzen im Harn vorkommende Schwefelsäure.

einen sehr geringen Niederschlag von Baryumsulfat. Fügt man alsdann zum klaren Filtrate einige Kubikzentimeter konzentrierte Salzsäure und kocht auf, so entsteht meist ein reichlicher Niederschlag von Baryumsulfat, indem durch die Mineralsäure die Phenolschwefelsäure in Phenol und Schwefelsäure gespalten und die letztere nun als Baryumsulfat ausgefällt wird. Normaler Menschenharn enthält erheblich mehr „Sulfatschwefelsäure" (A-) als „Ätherschwefelsäure" (B-Schwefelsäure); durchschnittliches Verhältnis von $A-:B-SO_4 = 10:1$; ein normaler Harn gibt daher in essigsaurer Lösung mit Baryumchlorid einen reichlichen Niederschlag von Baryumsulfat.

Verteilung der Karbolsäure im menschlichen Körper nach erfolgter Vergiftung mit tödlichem Ausgange.

C. Bischoff[1]) fand in den Leichenteilen eines Mannes, der nach Einnahme von 15 *cm*³ Acid. carbolic. liquefact. nach 15 Minuten gestorben war, die Karbolsäure wie folgt verteilt. Die Organe sind hierbei ganz frisch zur Untersuchung gelangt, und zwar wurde vom Magen nur wenig übersandt. Es wurden abgeschieden

aus	242 *g*	Magen- und Darminhalt	0·171 *g*	Phenol
„	112 *g*	Blut	0·028 *g*	„
„	1480 *g*	Leber	0·637 *g*	„
„	322 *g*	Niere	0·201 *g*	„
„	1445 *g*	Gehirn	0·314 *g*	„

Bischoff wandte hierbei die Destillationsmethode an und destillierte mit Wasserdämpfen so lange über, bis eine Probe des letztaufgegangenen Destillates mit Bromwasser keinen Niederschlag mehr gab. Dieser Vergiftungsfall zeigt, wie rasch die Karbolsäure resorbiert wird und wie rasch ihre Überleitung in die verschiedenen Organe erfolgt.

Wie rasch die Karbolsäure resorbiert wird, geht auch daraus hervor, daß der Harn schon $^1/_4$ Stunde nach Aufnahme derselben, per os oder subkutan, deutliche Karbolreaktion gibt; die größte Menge der resorbierten Karbolsäure ist nach 4—5 Stunden ausgeschieden. *Schaffer* (Journal f. prakt. Chemie, Neue Folge, 18, 282 [1878]) fand die gepaarte Schwefelsäure des Harns genau im Verhältnis des aufgenommenen Phenols vermehrt.

Über die Menge Phenol, die bei der Fäulnis von Eiweißstoffen entsteht, findet sich in der Literatur eine Angabe von *E. Baumann*[2]), der angibt, daß aus 100 *g* frischem Pankreas und 100 *g* nassem Fibrin bei Gegenwart von 250 *cm*³ Wasser und bei sechstägiger Fäulnis 0·073 bis

[1]) *C. Bischoff*, Über Verteilung von Giften im Organismus des Menschen in Vergiftungsfällen. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. **16.** 1337 (1883).

[2]) *E. Baumann*, Über die Bildung von Phenol bei der Fäulnis von Eiweißkörpern. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. 10. 685 (1877) und Zeitschr. f. physiol. Chemie. I. 61 (1877).

0·078 *g* Tribromphenol, entsprechend 0·0208 bis 0·022 *g* Phenol, erhalten werden. Die größte Menge der bei der Fäulnis der Eiweißstoffe gebildeten flüchtigen Phenole besteht aus p-Kresol.

Nachweis der Karbolsäure.

Karbolsäure destilliert mit Wasserdämpfen verhältnismäßig leicht über; es ist aber ein längeres Destillieren notwendig, um die letzten Anteile derselben überzutreiben. Karbolsäure gibt sich in den meisten Fällen schon durch ihren eigenartigen Geruch zu erkennen. Liegen größere Mengen derselben vor, so schwimmen in dem meist milchig trüben Destillate farblose oder rötlich gefärbte Öltropfen, die sich in Kali- oder Natronlauge klar auflösen. Reine, wasserfreie Karbolsäure schmilzt bei 40° bis 42° und destilliert zwischen 178° bis 182° über. Da bei der Fäulnis von Eiweißstoffen (s. oben) geringe Mengen von Phenol und besonders von p-Kresol gebildet werden, so lassen sich daher in dem Destillate von Leichenteilen, die schon stark in Verwesung übergegangen sind, fast immer Spuren dieser beiden Phenole nachweisen; ein solches Destillat aus gefaulten Leichenteilen gibt fast immer die *Millon*sche Probe und meist auch eine Reaktion mit Bromwasser.

Zum Nachweise der Karbolsäure dienen die folgenden Reaktionen:

1. *Millon*sche Reaktion. Beim Erhitzen mit dem *Millon*schen Reagens[1]) färbt sich eine selbst nur Spuren von Karbolsäure enthaltende Flüssigkeit rot. Ein Karbolwasser, das bei einer Verdünnung von 1 : 100.000 nur 20 *mg* Karbolsäure enthält, färbt sich hierbei noch deutlich rot. Falls nicht sehr verdünnte Phenollösungen vorliegen, tritt die Rotfärbung schon in der Kälte auf. Diese Reaktion ist zwar außerordentlich empfindlich, aber nicht charakteristisch für Karbolsäure, da sehr viel aromatische Stoffe, besonders einwertige Phenole und ihre Derivate sich gegen das *Millon*sche Reagens geradeso verhalten wie die Karbolsäure, z. B. die drei Kresole, ferner die Salizylsäure[2]), p-Oxyphenylessigsäure, p-Oxyphenylpropionsäure (Hydroparakumarsäure[3]), Tyrosin. Auch eine wässerige Anilinlösung färbt sich beim Erhitzen mit „Millon" dunkelrot.

2. Bromwasserreaktion. Überschüssiges Bromwasser fällt noch aus sehr verdünnten, wässerigen Phenollösungen einen gelblichweißen, kristallinischen Niederschlag, der im wesentlichen aus Tribromphenolbrom besteht. Sehr empfindliche Probe auf Karbolsäure: selbst bei einer Verdünnung der Phenollösung von 1 : 50000 erhält man bei längerem Stehen noch einen, zum Teil aus schön ausgebildeten Kriställchen bestehenden Niederschlag.

[1]) Über die Bereitung von *Millons* Reagens vgl. den Abschnitt „Die Bereitung der Reagenzien", S. 813.

[2]) Salizylsäure geht mit Wasserdämpfen in Spuren über, wenigstens in einer solchen Menge, daß sie im Destillate mit dem *Millon*schen Reagens nachgewiesen werden kann.

[3]) p-Oxyphenylessigsäure und Hydroparakumarsäure werden bei der Eiweißfäulnis gebildet; sie sind aber mit Wasserdämpfen nicht flüchtig.

Auch Salizylalkohol (Saligenin), Salizylaldehyd, Salizylsäure und p-Oxybenzoesäure geben mit überschüssigem gesättigtem Bromwasser schon in der Kälte quantitativ Tribromphenolbrom.

3. Eisenchloridreaktion. Stark verdünnte Eisenchloridlösung, tropfenweise zugesetzt, färbt eine wässerige Phenollösung blau oder blauviolett; auf Zusatz von Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure geht die Färbung in Gelb über. Diese Probe ist nicht so empfindlich wie die beiden erst angegebenen Reaktionen; sie bleibt ganz aus, wenn Mineralsäuren zugegen sind. Empfindlichkeit: etwa 1:1000.

4. Hypochloritprobe. Versetzt man eine wässerige Phenollösung zuerst mit wenig Ammoniak, dann mit 2—4 Tropfen Chlorkalk- oder Natriumhypochloritlösung und erwärmt gelinde, so färbt sich das Gemisch blau, bei sehr verdünnten Phenollösungen nach einiger Zeit grün bis grünblau. *F. A. Flückiger*[1]) läßt zu der mit wenig Ammoniak versetzten und in einer Porzellanschale befindlichen Phenollösung Bromdampf zutreten.

Quantitative Bestimmungen des Phenols.

1. Gewichtsanalytische Bestimmung als Tribromphenolbrom nach *W. Autenrieth* und *Fr. Beuttel.*[2])

Diese Methode beruht auf dem Verhalten wässeriger Phenollösungen gegen überschüssiges gesättigtes Bromwasser, durch welches das gesamte Phenol als Tribromphenolbrom, $C_6H_2Br_4O$ (s. oben), gefällt wird. Dieses ist, praktisch genommen, in kaltem Bromwasser unlöslich, infolgedessen diese Methode der Bestimmung der Karbolsäure recht befriedigende Werte liefert.

Ausführung. Man bringt die wässerige Phenollösung in eine geräumige Glasstöpselflasche und versetzt sie allmählich und unter Umschütteln mit so viel gesättigtem Bromwasser, daß die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit rotbraun gefärbt erscheint und sich über der Flüssigkeit Bromdämpfe bemerkbar machen. Nun läßt man unter häufigem Umschütteln 3 bis 4 Stunden lang kalt stehen, sammelt alsdann den Niederschlag in einem gewogenen Goochtiegel und trocknet ihn im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht. Aus dem Gewicht des erhaltenen Niederschlages berechnet sich der Phenolgehalt unter Zugrundelegung der folgenden Gleichung:

$$\underset{(409{\cdot}86)}{C_6H_2Br_4O} : \underset{(94{\cdot}05)}{C_6H_5OH} = \text{gefundene Menge Niederschlag} : x.$$

Da der Quotient 94·05 : 409·86 = 0·2295 ist, erfährt man die dem erhaltenen Niederschlage entsprechende Menge Phenol durch Multiplikation des Gewichtes des Niederschlages mit 0·2295.

---

[1]) Pharmazeutische Chemie. S. 287 (1879).

[2]) *W. Autenrieth* und *Fr. Beuttel*, Über die Bestimmung des Phenols, Salicylalkohols, der Salicylsäure etc. als Tribromphenolbrom. Archiv der Pharmazie. Bd. **248**. 112 (1910).

2. Maßanalytische Bestimmung nach *Beckurts-Koppeschaar.*[1])

Verdünnte Schwefelsäure macht aus Bromkalium Bromwasserstoffsäure (α) und aus bromsaurem Kalium Bromsäure (β) frei; diese beiden freien Säuren wirken dann unter Freiwerden von Brom nach γ aufeinander ein:

$$\alpha.\ 2\,KBr + H_2SO_4 = 2\,HBr + K_2SO_4.$$
$$\beta.\ 2\,KBrO_3 + H_2SO_4 = 2\,HBrO_3 + K_2SO_4.$$
$$\gamma.\ \begin{matrix} 5\,Br\ H \\ + Br\ O_3H \end{matrix} = 3\,Br_2 + 3\,H_2O.$$

Versetzt man daher ein Gemisch der Lösungen von Bromkalium und bromsaurem Kalium mit verdünnter Schwefelsäure, so wird Brom frei, welches gleichzeitig vorhandenes Phenol in ein Gemenge von Tribromphenol und Tribromphenolbrom überführt. Fügt man nun Jodkaliumlösung hinzu, so wird nicht nur das im Überschuß vorhandene freie Brom, sondern auch das eine labil gebundene Bromatom des Tribromphenolbroms gebunden, so daß schließlich sämtliches Phenol als Tribromphenol ausfällt:

$$\underset{\text{Tribromphenolbrom}}{C_6H_2Br_3OBr} + 2\,KJ = \underset{\text{Tribromphenolkalium.}}{C_6H_2Br_3OK} + KBr + J_2$$

Auf 1 Mol. Phenol kommen demnach 6 Atome Brom, wie dies in der folgenden Gesamtgleichung zum Ausdruck kommt:

$$5KBr + KBrO_3 + 6H_2SO_4 + C_6H_5\,.\,OH = C_6H_2Br_3\,.\,OH + 3HBr + 6KHSO_4 + 3H_2O.$$

Erfordernisse für die Titration:

1. $\frac{1}{100}$ n-Kaliumbromidlösung: enthält $\frac{5KBr}{100}\,g = \frac{595 \cdot 6}{100} = 5 \cdot 956\,g$ KBr im Liter.

2. $\frac{1}{100}$ n-Kaliumbromatlösung: enthält $\frac{1KBrO_3}{100}\,g = \frac{167 \cdot 17}{100} = 1 \cdot 6717\,g$ $KBrO_3$ im Liter.

3. $\frac{1}{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung: enthält $\frac{1}{10}\,Na_2S_2O_3 \,.\, 5H_2O\,g = 24 \cdot 83\,g$ im Liter.

4. Eine Jodkaliumlösung mit 125 *g* KJ im Liter.

Ausführung. In eine gut verschließbare Glasstöpselflasche bringt man 25 *cm*³ der wässerigen Phenollösung, z. B. Destillat, je 50 *cm*³ der $\frac{1}{100}$ n-Kaliumbromid- und $\frac{1}{100}$ n-Kaliumbromatlösung sowie 5 *cm*³ reine konzentrierte Schwefelsäure und schüttelt einige Minuten kräftig durch. Hierbei tritt ganz allmählich eine Opalisierung der Flüssigkeit ein, die unter Abscheidung von Tribromphenol und Tribromphenolbrom alsbald zunimmt; der Überschuß an Brom macht sich erst nach einigen Minuten durch Eintritt der gelben Farbe bemerkbar. Nach weiteren 15 Minuten fügt man zum Gemisch

[1]) *H. Beckurts,* Über die quantitative Bestimmung der Carbolsäure als Tribromphenol. Archiv d. Pharmazie. Bd. 24. 562—572 (1886).

10 *cm*³ der Jodkaliumlösung hinzu, schüttelt um und titriert das hierbei freigewordene Jod nach kürzerem Stehen mit $\frac{1}{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung.

Berechnung. Aus der Mischung von je 1000 *cm*³ der $\frac{1}{100}$ n-Kaliumbromid- und $\frac{1}{100}$ n-Kaliumbromatlösung werden $\frac{6 \text{ Grammatome Brom}}{100}$ $= \frac{6 \times 79{\cdot}96}{100} = 4{\cdot}7976$ *g* Brom frei und somit aus je 50 *cm*³ der beiden Lösungen 0·23988 *g* Brom; dieses Brom kann nach der Proportion

$$6\,Br : C_6H_5OH = 0{\cdot}23988 : x$$
$$479{\cdot}76 : 94{\cdot}05 = 0{\cdot}23988 : x \quad (x = 0{\cdot}04704)$$

0·04704 *g* Phenol in Tribromphenol überführen.

1 *cm*³ $\frac{1}{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung entspricht 0·012697 *g* Jod und diese Jodmenge wiederum 0·007996 *g* Brom. Diese Menge Brom ist aber imstande, nach der Proportion (siehe oben)

$$6\,Br : C_6H_5OH = 0{\cdot}007996 : x$$
$$479{\cdot}76 : 94{\cdot}05 = 0{\cdot}007996 : x \quad (x = 0{\cdot}00157)$$

0·00157 *g* Phenol in Tribromphenol überzuführen. Man muß demnach für jeden *cm*³ $\frac{1}{10}$ n-Natriumthiosulfatlösung, der bei der Titration des ausgeschiedenen Jods verbraucht wird, von den 0·04704 *g* Phenol 0·00157 *g* abziehen, um die Menge Phenol zu erfahren, welche in der ursprünglich abgemessenen Phenollösung (25 *cm*³) vorhanden war.

Für die Bestimmung der Phenole (Phenol + p-Kresol) im Harn arbeitet man nach der jodometrischen Methode von *J. Messinger* und *G. Vortmann* [1]), welche von *Kossler* und *Penny* [2]) für den Harn ausgearbeitet wurde.

Chloroform.

Verhalten im menschlichen Organismus. Beim Einatmen aufgenommenes Chloroform geht aus der Atemluft zunächst ins Blutplasma und von hier aus in die roten Blutkörperchen über, in welchen es in relativ großen Mengen aufgespeichert werden kann. Beim Durchleiten von Luft wird das Chloroform aus dem Blute wieder völlig ausgetrieben. Nach *Pohl* (vgl. *R. Kobert*, Intoxikationen) vermag Blut 0·62% Chloroform zu binden. Drei Viertel von dieser Menge Chloroform sitzt in den roten Blutkörperchen. Auf der Höhe der ungefährlichen Chloroformnarkose betrug der Chloroformgehalt des Blutes nur 0·035%. Die Resorption des Chloroforms erfolgt von allen Körperstellen aus. Infolge der Reizwirkung

[1]) *J. Messinger* und *G. Vortmann*, Über eine neue Klasse von jodierten Phenolen. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **22**. 2312 (1889) und **23**. 2753 (1890).

[2]) *A. Kossler*, Über eine maßanalytische Bestimmung der Phenole in Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**. 117 (1892).

auf die Schleimhäute der Respirationswege erklären sich einige der Störungen, welche zu Beginn der Chloroformnarkose vorkommen können, wie Husten, Speichelfluß, reflektorische Atmungs- und Herzschlagverlangsamung. Die Gefäße überlebender Organe werden durch Chloroform schon in kleinen Dosen durch Lähmung erweitert. Entsprechend der Lähmung des Gehirns sinkt der Blutdruck; auch das Herz arbeitet schwächer und langsamer. Von verschiedenen Forschern ist die Einwirkung des eingeatmeten Chloroforms auf den Stoffwechsel des Menschen und der Tiere untersucht worden. Diese Untersuchungen haben ergeben, daß der Harn nach länger dauernder Chloroformnarkose, infolge des vermehrten Eiweißzerfalls, eine Steigerung der Stickstoffausscheidung zeigt; ferner ist der neutrale Schwefel und der Chlorgehalt des Harns vermehrt. Die Steigerung des letzteren ist wohl, wenigstens zum Teil, auf die Umwandlung des Chloroforms in Chlorid zurückzuführen. Auch die Azidität des Harns ist stark vermehrt; endlich zeichnet sich der Chloroformharn durch einen hohen Gehalt an reduzierend wirkenden Substanzen aus. Der gesteigerte Eiweißzerfall unter dem Einflusse der Chloroformnarkose bezieht sich nicht nur auf Vorratseiweiß, sondern auch auf Organeiweiß. So erklärt sich wohl die bei länger oder öfter wiederholter Narkose eintretende Degeneration der roten Blutkörperchen, der drüsigen Organe, des Herzens etc.

Chloroform wirkt als Antiseptikum. Bei geeigneter Konzentration des Chloroforms in der Luft oder in einer Flüssigkeit gelingt es, isolierte tierische und pflanzliche Zellen, wie Leukozyten, Flimmerzellen, Hefezellen, Algen, Sporen zu lähmen, und zwar vorübergehend oder dauernd. So erklärt sich die Anwendung des Chloroformwassers, d. h. der etwa 1%igen Lösung des Chloroforms in Wasser, als Antiseptikum. Will man z. B. Harn konservieren, so fügt man etwas Chloroform zu; ebenso wenn man Enzymwirkungen studieren, aber Bakterienwirkungen ausschließen will. Aber nicht alle Mikroben werden unter der Einwirkung des Chloroformwassers gelähmt oder abgetötet.

Verteilung des Chloroforms in der Leiche. Nach Untersuchungen von *Pohl* und *Hans Meyer* bieten die roten Blutkörperchen und die Gehirnsubstanz noch die größte Wahrscheinlichkeit, Chloroform finden zu lassen. Der Magensaft enthält nach einer Inhalation wenig, der Harn aber höchstens Spuren von unverändertem Chloroform. Nach der Chloroformnarkose von 15 Personen hat man 13mal in deren Harn gar kein Chloroform und nur 2mal Spuren desselben vorgefunden.

Der Nachweis des Chloroforms als solches in der Leiche ist nach *Kobert* bisher überhaupt nur ausnahmsweise geglückt, da das Gift im menschlichen Organismus zum Teil in Chlormetalle übergeführt, zum Teil mit der Exspirationsluft schnell wieder ausgeatmet wird. Der Chloroformnachweis in der Einatmungsluft der Patienten gelingt in der Regel noch 24 Stunden nach der Narkose. Die Retention des Chloroforms soll nach *Büdinger* durch den Schleim der Respirationswege zustande kommen.

Nachweis des Chloroforms.

Chloroform geht mit Wasserdämpfen leicht über und findet sich daher in dem zuerst aufgesammelten Destillate aus einem Untersuchungsmaterial vor. Bei Vorhandensein größerer Mengen scheidet sich Chloroform im Destillate in Form schwerer, farbloser Öltröpfchen aus; liegt nur wenig Chloroform vor, so bleibt es in der wässerigen Flüssigkeit gelöst, die dann den charakteristischen Geruch und süßlichen Geschmack des Chloroforms annimmt. Chloroform wird im Destillate durch die folgenden Reaktionen nachgewiesen:

1. Isonitrilreaktion. Beim Erhitzen einer chloroformhaltigen Flüssigkeit mit 1 bis 2 Tröpfchen Anilin und mit wässeriger oder alkoholischer Kalilauge entsteht Phenylisonitril ($C_6 H_5 NC$), das an seinem durchdringenden, widerlichen Geruche leicht erkannt wird. Eine sehr empfindliche Probe, mittelst deren sich ein Teil Chloroform, in 6000 Teilen Alkohol gelöst, noch sicher nachweisen läßt *(A. W. Hofmann)*.

Bemerkungen. Chloral, Bromal, Bromoform, Jodoform und Tetrachlorkohlenstoff geben ebenfalls die Isonitrilprobe.

Zu beachten ist ferner, daß beim Kochen von Anilin mit Kalilauge allein, also ohne Chloroform, ein eigenartiger aromatischer Geruch auftritt, der freilich mit dem höchst widerwärtigen Geruche des Phenylisonitrils nicht gut verwechselt werden kann. In zweifelhaften Fällen stelle man eine Kontrollprobe an, indem man wenig Wasser mit einem Tropfen Anilin, einer Spur Chloroform und Kalilauge erwärmt und dann den hierbei auftretenden Geruch mit dem fraglichen Geruche der eigentlichen Probe vergleicht.

2. Resorzinreaktion von *Schwarz.*[1]) Löst man etwa 0·1 *g* Resorzin in 2 cm^3 Wasser, fügt einige Tropfen Natronlauge sowie eine chloroformhaltige Flüssigkeit hinzu und erhitzt alsdann zum Sieden, so färbt sich das Gemisch gelbrot und zeigt selbst noch bei starker Verdünnung eine schöne gelbgrüne Fluoreszenz.

Chloral, Bromal, Bromoform und Jodoform geben die gleiche Reaktion.

3. Naphtholreaktion von *Lustgarten.*[2]) Löst man einige Centigramm α- oder β-Naphtol in 1 bis 2 cm^3 starker Kalilauge (1 : 2), erwärmt auf etwa 50° und fügt nun eine Chloroform enthaltende Flüssigkeit hinzu, so färbt sich das Gemisch blau oder mehr blaugrün; diese Färbung, die bei Verwendung von β-Naphthol weniger beständig ist, geht an der Luft erst in Grün, dann in Braun über. — Beim Ansäuern der blauen Flüssigkeit fällt ein ziegelroter Niederschlag, nämlich ein Gemenge von Naphthol und einem roten Farbstoff aus.

Chloral, Bromal, Bromoform und Jodoform geben ebenfalls die *Lustgarten*sche Naphtholreaktion.

4. Reduktionsproben.

a) Eine wässerige Chloroformlösung reduziert beim Erwärmen die *Fehling*sche Lösung unter Ausscheidung von Kupferoxydul.

---

[1]) *Schwarz, Fresenius'* Zeitschr. f. analyt. Chem. 27, 668.

[2]) *S. Lustgarten,* Über den Nachweis von Chloroform, Jodoform und Naphtol in tierischen Flüssigkeiten und Organen. Monatshefte f. Chemie. 3. 715 (1882).

b) Erwärmt man ein Gemisch aus Silbernitratlösung, überschüssigen Ammoniak und wässeriger Chloroformlösung, so scheidet sich schwarzes metallisches Silber aus.

Diese Reduktionsproben sind selbstverständlich für Chloroform nicht charakteristisch, da ja viele flüchtige organische Stoffe, wie Ameisensäure und Aldehyde, die unter Umständen auch in Destillaten von Leichenteilen vorkommen können, die *Fehling*sche Lösung sowie eine ammoniakalische Silbernitratlösung ebenfalls reduzieren.

Quantitative Bestimmung des Chloroforms in Leichenteilen.

Eine abgewogene Menge der betreffenden Leichenteile wird erst mit weinsäurehaltigem Wasser angerührt, dann so lange destilliert, bis eine kleine Probe des zuletzt aufgesammelten Destillates die Isonitrilprobe nicht mehr gibt. Das Destillat wird zur Bindung etwa vorhandener, freier Salzsäure zuerst mit einer Spur Kalziumcarbonat versetzt, dann wird durch diese Flüssigkeit unter Erwärmen auf etwa 60° ein Strom gewaschener Luft gesaugt, diese durch ein lebhaft glühendes Verbrennungsrohr geleitet und die hierbei entstandenen Verbrennungsprodukte in einer Silbernitratlösung, die mit Salpetersäure angesäuert ist, aufgefangen; das hierbei gefällte Chlorsilber (N) gelangt zur Wägung.

Berechnung: $3 AgCl : CHCl_3 = N : x$.

Diese Bestimmung beruht auf der Zersetzung des Chloroforms in Chlorwasserstoffsäure, Kohlenoxyd und Ameisensäure, wenn es mit Wasserdampf auf über 200° erhitzt wird:

$$CHCl_3 + H_2O = CO + 3HCl \text{ und } CHCl_3 + 2H_2O = HCOOH + 3HCl.$$

Durch eine Reihe blinder Versuche hat *B. Fischer*[1] gezeigt, daß Magen, Mageninhalt und Blut nicht chloroformierter Personen unter diesen Umständen keine flüchtigen Chlorverbindungen liefern. Nach dieser Methode fand *B. Fischer* in der Leiche eines Arbeiters, der während der Chloroformnarkose verstorben war, die folgenden Mengen Chloroform:

In 985 *g* Magen samt Inhalt und in Teilen des Darms 0·01 *g* Chloroform
„ 780 *g* Lunge, Blut aus dem Herzen . . . . . 0·055 *g* „
„ 445 *g* Teilen von Milz, Niere, Leber . . . . . Spuren „
„ 480 *g* Gehirn . . . . 0·07 *g* „

Die Hauptmenge des Chloroforms hat sich also in der Gehirnmasse und im Blute vorgefunden.

Chloralhydrat.

Chloralhydrat, $CCl_3 . CH(OH)_2$, bildet farblose, durchsichtige, trockene, luftbeständige Kristalle, die sich in Wasser, Weingeist und

[1]) Jahresbericht des chem. Untersuchungsamtes der Stadt Breslau für die Zeit vom 1. April 1894 bis 31. März 1895.

Äther leicht, in Chloroform, Schwefelkohlenstoff und fetten Ölen weniger leicht lösen. Chloralhydrat riecht stechend und schmeckt schwach bitter. Es destilliert aus einer mit Weinsäure angesäuerten, wässerigen Lösung nur äußerst langsam mit Wasserdämpfen über, so daß schon eine längere Destillation notwendig ist, um erheblichere Mengen von Chloralhydrat in das Destillat überzuführen. Chloralhydrat findet sich als solches im Destillate vor; destilliert man das Untersuchungsmaterial bei alkalischer Reaktion, so enthält das Destillat kein Chlorhydrat, wohl aber aus diesem hervorgegangenes Chloroform.

Nachweis des Chloralhydrats.

Chloralhydrat gibt die gleichen Reaktionen wie das Chloroform, also die Isonitril-, Resorcin- und die *Lustgarten*sche α-Naphtholprobe, nur fehlt dem chloralhydrathaltigen Destillat der charakteristische Chloroformgeruch, der freilich in stark verdünnten wässerigen Chloroformlösungen kaum wahrzunehmen ist. — Im Unterschiede zu Chloroform gibt Chloralhydrat die Aldehydreaktion mit *Nesslers* Reagens. Man versetzt das zu prüfende Destillat mit einigen Tropfen *Nessler*schem Reagens und schüttelt um: ist das Destillat chloralhydrathaltig, so entsteht jetzt ein gelbroter, nach einiger Zeit schmutzig gelbgrün werdender Niederschlag.

Liegt nicht zu wenig Chloralhydrat vor, so kann es in der Weise nachgewiesen werden, daß man das erhaltene Destillat mit etwas gebrannter Magnesia versetzt und dieses Gemisch etwa eine halbe Stunde am Rückflußkühler im kochenden Wasserbade unter häufigem Umschütteln erhitzt: vorhandenes Chloralhydrat wird nach der Gleichung:

$$2CCl_3 \,.\, CH(OH)_2 + MgO = 2CHCl_3 + (HCOO)_2Mg + H_2O$$

in Chloroform und Ameisensäure zerlegt.

Man sucht nun die beiden Bestandteile der Reaktion, das Chloroform und die Ameisensäure, nachzuweisen, indem man einige Kubikzentimeter von der Flüssigkeit abdestilliert und das Destillat mit Hilfe der Isonitril-, Resorcin- und Naphtholprobe auf Chloroform prüft. Den Destillationsrückstand aber filtriert man ab, dampft das Filtrat auf einige Kubikcentimeter ein und macht daraus zur Prüfung der Ameisensäure zwei Teile. Den einen Teil erwärmt man mit einigen Tropfen Quecksilberchloridlösung; bei Vorhandensein von Ameisensäure wird weißes Quecksilberchlorür gefällt; den anderen Teil erhitzt man mit wenig Silbernitratlösung, aus welcher metallisches Silber als schwarzer Niederschlag gefällt wird, wenn das Filtrat Ameisensäure enthalten hat.

Verhalten des Chloralhydrats im Tierkörper.

Nur eine sehr kleine Menge des innerlich eingenommenen Chloralhydrats geht als solches in den Harn über; bei weitem der größere Teil desselben wird im menschlichen Organismus in eine gepaarte Glukuronsäure, in die linksdrehende Urochloralsäure $C_8H_{11}Cl_3O_3$ umgewandelt,

die mit dem Harn ausgeschieden wird (*v. Mering* und *Musculus*[1]). Beim Erwärmen mit verdünnten Säuren wird die Urochloralsäure in Trichloräthylalkohol und die rechtsdrehende Glukuronsäure hydrolytisch gespalten:

$$\underset{\text{Urochloralsäure}}{C_8H_{11}Cl_3O_7} + H_2O = \underset{\text{Trichloräthylalkohol}}{CCl_3 . CH_2 . OH} + \underset{\text{Glukuronsäure}}{HOOC(CHOH)_4COH}.$$

Urochloralsäure muß nach diesem Verhalten bei der Hydrolyse als eine Trichloräthylglukuronsäure aufgefaßt werden. Sie reduziert in der Wärme Silberlösung sowie alkalische Kupfer- und Wismutlösung. Der Chloralharn verhält sich demnach in mancher Hinsicht wie der Zuckerharn, nur ist er im Unterschiede zum letzteren stark linksdrehend.

Quantitative Bestimmung des Chloralhydrats in Blut und Geweben nach *C. Archangelsky*.[2])

Das betreffende Ausgangsmaterial wird mit dem gleichen Gewicht 20%iger Phosphorsäure 12—20 Stunden lang destilliert; ist das Destillat trübe oder gelb gefärbt, so wird die Destillation wiederholt. Das Destillat wird hierauf, behufs vollständiger Spaltung des Chloralhydrats in Chloroform und Ameisensäure, mit 50 cm^3 Natronlauge versetzt, dann auf dem Wasserbade bis auf etwa 20 cm^3 eingeengt. Hierauf wird genau neutralisiert und mit überschüssiger Quecksilberchloridlösung etwa 6 Stunden lang auf dem Wasserbade erhitzt; das gefällte Quecksilberchlorür wird schließlich gewogen. Bei Zusatz bekannter Mengen Chloralhydrat zu Blut und Organen ergab das Verfahren befriedigende Werte. Mittelst dieser Methode hat *Archangelsky* ermittelt, daß sich Chloralhydrat im Blute nicht gleichmäßig verteilt und in erster Linie in den Blutkörperchen enthalten ist. Im Gehirn ist zu Beginn der Narkose weniger Chloralhydrat vorhanden als im Blut; hält aber die Narkose längere Zeit an, so wird das Gehirn prozentual chloralreicher als das Blut. Ferner hat *Archangelsky* die Menge Chloralhydrat bestimmt, die im Blut vorhanden sein muß, wenn Narkose eintreten soll; beim Hunde muß 0·03—0·05% Chloralhydrat im Blute enthalten sein; bei einem Gehalt des Blutes von 0·12% trat Respirationsstillstand ein.

Jodoform.

Jodoform, CHJ_3, bildet glänzende, hexagonale Blättchen oder Tafeln oder ein feines, kristallinisches Pulver von zitronengelber Farbe und von durchdringendem, etwas safranartigem Geruche. Der Schmelzpunkt liegt annähernd bei 120°. Es ist fast unlöslich in Wasser, löslich in 70 Teilen kaltem, in ungefähr 10 Teilen siedendem Weingeist und in 10 Teilen Äther; auch von Chloroform wird es reichlich gelöst. Beim Erhitzen von Jodoform entwickeln sich violette Dämpfe von Jod.

Nachweis des Jodoforms.

Jodoform destilliert mit Wasserdämpfen ziemlich leicht über und liefert ein milchig weißes, trübes Destillat von charakteristischem Geruche.

---

[1]) *v. Mering* und *Musculus*, Über einen neuen Körper im Chloralharn und *v. Mering*, Zur Kenntnis der Reduktionsprocesse im Tierkörper. Berichte der Deutsch. chem. Gesellsch. 8. 662 (1875) und 15, 1019 (1882).

[2]) *C. Archangelsky*, Über die Verteilung des Chloralhydrats und Acetons im Organismus. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 46. 347 (1901).

Zum sicheren Nachweis des Jodoforms schüttelt man das aufgesammelte Destillat mit Äther aus und läßt den Ätherauszug freiwillig verdunsten. Liegen mehr als Spuren von Jodoform vor, so hinterbleibt es in Form mikroskopisch kleiner, gelblich gefärbter, hexagonaler Blättchen. Zur Identifizierung mit Jodoform löst man den Verdunstungsrückstand, falls er jodoformähnlich riecht, in wenig warmem absolutem Alkohol und führt mit dieser Lösung die folgenden Reaktionen aus:

Reaktion von *Lustgarten.*[1])

In einem kleineren, engen Reagenzglase erhitzt man sehr wenig Phenolkaliumlösung, d. i. eine Auflösung von kristallisiertem Phenol in Kalilauge, mit 2—3 Tropfen der alkoholischen Lösung des Verdunstungsrückstandes ganz gelinde über kleiner Flamme. Bei Anwesenheit von Jodoform bildet sich am Boden des Reagenzglases ein roter Beschlag, der in einigen Tropfen verdünnten Alkohols mit karminroter Farbe löslich ist.

Man führe ferner die Resorzin- und die Isonitril-Probe aus (vgl. Chloroform).

Nitrobenzol.

Nitrobenzol, $C_6H_5NO_2$, bildet eine gelblich gefärbte, stark lichtbrechende, nach Bittermandelöl riechende Flüssigkeit vom Siedepunkt 209° bei 760 *mm*; in verdünnter wässeriger Lösung schmeckt es ausgesprochen süß.

Nitrobenzol gehört zu den stark giftig wirkenden Substanzen. Beim Menschen ist der Tod schon nach Einnahme sehr kleiner Mengen Nitrobenzol eingetreten, nämlich nach innerlicher Aufnahme von 20, ja sogar von nur 7—8 Tropfen des Giftes. Freilich ist andrerseits nach viel größeren Gaben völlige Wiederherstellung von der Vergiftung beobachtet worden. Auch durch Einatmen von Nitrobenzoldampf sind Vergiftungen mit tödlichem Ausgange zustande gekommen. Nitrobenzol hat in den letzten Jahren besonders als Abortivmittel eine gewisse Rolle gespielt. Nitrobenzol ist ein Blutgift, indem es verändernd auf das Blut einwirkt, welches unter Gestaltveränderung und Lösung der roten Blutkörperchen eine schokoladebraune Farbe annimmt. Das Blut verliert dabei die Fähigkeit, Sauerstoff aufzunehmen. Der Sauerstoffgehalt des Blutes von durch Nitrobenzol vergifteten Personen soll bis unter 1% sinken können, wodurch Tod unter Erstickung herbeigeführt wird. Das Blut gesunder Personen enthält etwa 17 Volumprozente Sauerstoff. Im Nitrobenzolblut scheint kein Methämoglobin vorhanden zu sein; bei der spektroskopischen Untersuchung eines derartigen Blutes ist neben den beiden Oxyhämoglobinstreifen noch ein besonderes, zwischen C und D gelegenes Absorptionsband gefunden worden (*Filehne*scher Nitrobenzolstreifen). Wahr-

[1]) *S. Lustgarten,* Über den Nachweis von Chloroform, Jodoform und Naphtol in tierischen Flüssigkeiten und Organen. Monatsh. f. Chemie. 3. 715 (1882).



scheinlich eine Folge der schweren Löslichkeit ist für das Gift eine bestimmte Inkubationszeit notwendig, denn nach innerlicher Darreichung des Nitrobenzols bis zum Eintritt der Giftwirkung verstreichen in der Regel 2—3 Stunden. In einem Falle kam bei einer Frau, die zu Abortivzwecken 10 Tropfen Mirbanöl genommen hatte, erst 8 Stunden nach Einnahme des Giftes eine Giftwirkung zum Ausbruch, nämlich Bewußtlosigkeit und Cyanose.

Ein Teil des aufgenommenen Nitrobenzols geht in den Harn über; Anilin scheint aus demselben im Organismus nicht zu entstehen. Hämoglobin oder Methämoglobin sind bei Nitrobenzolvergiftung im Menschenharn nur ausnahmsweise gefunden worden, wohl aber findet sich manchmal ein brauner Farbstoff im Harn vor. Der Nitrobenzolharn reduziert die *Fehling*sche Lösung, ist nicht gärungsfähig und deutlich linksdrehend. Vielleicht enthält er eine gepaarte Glukuronsäure.

Nachweis des Nitrobenzols.

Alle Organe und auch der Harn riechen bei Nitrobenzolvergiftung nach dem Gifte. Zum chemischen Nachweis des Nitrobenzols destilliert man die betreffenden Organe mit Wasser. Nitrobenzol destilliert hierbei ziemlich leicht über und scheidet sich im Destillate in Form von gelblich gefärbten, charakteristisch riechenden Öltröpfchen aus, die in Wasser untersinken. Zum sicheren Nachweis des Nitrobenzols reduziert man es zu Anilin und weist dieses nach. Zu dem Zwecke schüttelt man die ausgeschiedenen Öltröpfchen oder, falls die Trennung derselben von der wässerigen Flüssigkeit nicht möglich ist, das Destillat direkt mit zwei oder drei Stückchen Zink oder wenig granuliertem Zinn und einigen Kubikzentimetern konzentrierter Salzsäure so lange, bis der Geruch nach Nitrobenzol verschwunden ist, versetzt die vom überschüssigen Metall abgegossene salzsaure Lösung mit Kalilauge im Überschusse, schüttelt das hierbei frei gewordene Anilin mit Äther aus und läßt die in einem Scheidetrichter abgetrennte Ätherlösung eindunsten. Die zurückbleibenden Öltröpfchen löst man unter Umschütteln in Wasser auf und prüft diese Lösung mit Chlorkalklösung und mit Hilfe der Isonitrilprobe auf Anilin (vgl. dieses).

Anilin.

Anilin, $C_6H_5.NH_2$, bildet eine farblose, ölige, stark lichtbrechende, eigentümlich aromatisch riechende und brennend schmeckende Flüssigkeit, die sich an der Luft alsbald gelb bis braun färbt, um schließlich vollständig zu verharzen. Siedepunkt 183°. Von Wasser wird Anilin nur in geringer Menge (1:31) gelöst, dagegen löst es sich in jedem Verhältnis in Alkohol, Äther, Benzol, Chloroform und Schwefelkohlenstoff. Es wirkt nicht auf Lackmus; die Anilinsalze reagieren sauer. Anilin ist ein Gift von mäßig starker Wirkung. Kleinere Hunde sterben nach Gaben von 1·5—2 *g* Anilin, die im Laufe eines Tages gegeben werden. Für den

Menschen ist die tödliche Dose noch nicht sicher festgestellt; 3—4 *g* Anilin, auf einmal eingenommen, sollen schon sehr schwere Vergiftungserscheinungen hervorrufen. Die tödliche Dose liegt auf jeden Fall unter 25 *g*, denn an dieser Menge Anilin verstarb ein kräftiger Mann. Auch durch Einatmen von Anilindämpfen können schwere, selbst tödliche Vergiftungen zustande kommen.

Anilin ist ein typischer Methämoglobinbildner, also ein Blutgift. Daß Oxyhämoglobin durch Anilin in Methämoglobin übergeführt wird, läßt sich im Reagenzglase zeigen, indem man Blut mit einer wässerigen Lösung von Anilin versetzt. Unter dem Einflusse des Anilins erleiden die roten Blutkörperchen eine Gestaltsveränderung und zerfallen zum Teil. Durch den Zerfall der roten Blutkörperchen tritt eine Verminderung des Gehaltes des Blutes an disponiblem Sauerstoff ein, so daß dieser nur noch 5—10 Volumprozente beträgt, gegen 15—20% unter normalen Verhältnissen. Bei durch Anilin vergifteten Personen ist also die Zahl der roten Blutkörperchen stark vermindert, nicht aber die der weißen Blutzellen.

Nach Untersuchungen von *R. v. Engelhardt*[1]) soll Anilin im menschlichen Organismus zum Teil in Anilinschwarz oder in eine diesem ähnliche, wasserunlösliche Verbindung umgewandelt werden, welche in Form schwarzblauer Körnchen in jedem Blutstropfen und im Harn auf der Höhe der Anilinvergiftung nachgewiesen werden kann. — Die Entgiftung erfolgt in der Weise, daß das Anilin im Organismus erst zu p-Amidophenol, $HO.C_6H_4.NH_2$ (1·4), oxydiert wird, das sich, wie alle Phenole, mit Schwefelsäure zu einer Ätherschwefelsäure, nämlich der p-Amidophenolschwefelsäure, $HO.SO_2.O.C_6H_4.NH_2$ (1·4), paart, welche als Alkalisalz durch die Niere ausgeschieden wird und dann im Harn erscheint. Zum Teil wird das durch Oxydation des Anilins entstandene p-Amidophenol als gepaarte Glukuronsäure ausgeschieden. Auf der Bildung dieser gepaarten Säure beruht wohl das meist beobachtete Reduktionsvermögen des Anilinharns gegen *Fehling*sche Lösung. In schweren Fällen von Anilinvergiftung ist im Harn auch Anilin als solches aufgefunden worden. Der Anilinharn ist meist stark dunkel gefärbt. Außer den bereits angeführten Substanzen wurden im Harn bei Anilinvergiftung ein dunkler Farbstoff, ferner Hämoglobin, Methämoglobin und in reichlicherer Menge Urobilin nachgewiesen.

Nachweis des Anilins.

Als ziemlich schwache Base geht Anilin aus weinsaurer Lösung mit Wasserdämpfen zum Teil über, wenigstens in einer solchen Menge, daß es im Destillate mit Hilfe der unten angegebenen Reaktionen nachgewiesen werden kann. Will man das Anilin aus irgend einem Untersuchungsmaterial zwecks einer quantitativen Bestimmung möglichst voll-

[1]) Beiträge zur Toxikologie des Anilins. Franz. Dissertation. Dorpat 1888.

ständig abdestillieren, so macht man das betreffende mit Wasser angerührte Objekt mit Alkalilauge oder Natriumkarbonatlösung stark alkalisch und destilliert es dann ab. Da Anilin in etwa 30 Teilen Wasser von 15° löslich ist, können selbst erheblichere Mengen desselben im aufgesammelten Destillate gelöst bleiben. Nur wenn größere Mengen Anilin vorhanden sind, kann es sich in der abdestillierten Flüssigkeit in Form von öligen Tröpfchen abscheiden. Eine wässerige Anilinlösung, Anilinwasser, färbt Fichtenholz und Hollundermark intensiv gelb. Im Destillate wird Anilin durch die folgenden Reaktionen erkannt:

1. Chlorkalkprobe. Man versetzt das Destillat tropfenweise mit wässeriger Chlorkalk- oder Natriumhypochloritlösung; bei Vorhandensein von Anilin nimmt das Destillat eine violettblaue oder mehr purpurviolette Färbung an, die allmählich in ein schmutziges Rot übergeht. Fügt man jetzt verdünnte, mit etwas Ammoniak versetzte wässerige Phenollösung hinzu, so färbt sich das Gemisch schön blau. Die blaue Farbe ist recht beständig. Empfindlichkeit: 1:66000.

2. Isonitrilprobe. Beim Erhitzen des Destillates mit einigen Tröpfchen Chloroform und Kalilauge tritt der widerliche Geruch des Phenylisonitrils auf, falls das Destillat Anilin enthält.

3. Bromwasser fällt einen fleischfarbenen Niederschlag aus, wenn das Destillat anilinhaltig ist. Empfindlichkeit: 1:66000.

Schwefelkohlenstoff.

Schwefelkohlenstoff, CS_2, bildet eine farblose, stark lichtbrechende, charakteristisch riechende, in Wasser nur wenig lösliche Flüssigkeit; über die Löslichkeit des Schwefelkohlenstoffes in Wasser weichen die Angaben in der Literatur weit voneinander ab. 1 *l* Wasser löst bei 13 bis 14° 2·03 *g* *(Page)*, bei 15—16° 1·81 *g* *(Chancel, Parmentier)*, 2—3 *g* *(Ckindi)*, 3·4—4·52 *g* *(Peligot)* Schwefelkohlenstoff. Mit absolutem Alkohol, mit Äther, ätherischen und fetten Ölen läßt sich Schwefelkohlenstoff in jedem Verhältnisse mischen.

Bei innerlicher Darreichung ist Schwefelkohlenstoff ein stark wirkendes Gift, und zwar ein Blutgift, indem es insbesondere den Zerfall der roten Blutkörperchen bewirkt. Auch beim Einatmen von Schwefelkohlendämpfen können schwere Vergiftungserscheinungen auftreten. Nachdem man früher angenommen hatte, daß Schwefelkohlenstoff ein typischer Methämoglobinbildner wäre, haben Untersuchungen aus den letzten Jahren ergeben, daß diese Annahme nicht richtig war. Schwefelkohlenstoff ruft schwere Schädigungen der roten Blutkörperchen mit auftretender Hämolyse hervor; nach *R. Kobert* (Intoxikationen) wirkt es infolge seiner Lipoidlöslichkeit auf das Blut und das Zentralnervensystem schädigend ein. In einem ähnlichen Sinne hat sich vor kurzem *E. Harmsen* [1]) geäußert: Schwefelkohlenstoff ist ein starkes Blutgift, das eine Abnahme

[1]) Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Medizin etc. 30, 422 (1905).

der Zahl der roten Blutkörperchen und des Hämoglobingehaltes derselben nebst Leukozytose bewirkt.

Nachweis des Schwefelkohlenstoffes.

Schwefelkohlenstoff geht mit den Dämpfen des Wassers verhältnismäßig langsam über. Bei fraktionierter Destillation kann man daher auch die zweite und selbst die dritte Fraktion für den Nachweis von etwa vorhandenem Schwefelkohlenstoff verwenden. Löst man beispielsweise 2 Tröpfchen Schwefelkohlenstoff in 100 cm^3 Wasser auf und destilliert 40 cm^3 davon ab, so kann man auch noch in den weiteren 10 cm^3 Destillat deutlich Schwefelkohlenstoff nachweisen. Geringere Mengen desselben bleiben in dem wässerigen Destillate gelöst. Eine derartige wässerige Lösung riecht nicht besonders stark nach Schwefelkohlenstoff. In dem Destillate wird Schwefelkohlenstoff durch die folgenden Reaktionen erkannt:

1. Versetzt man eine Schwefelkohlenstoff enthaltende Flüssigkeit mit einigen Tropfen Bleiazetatlösung, so entsteht weder ein Niederschlag, noch macht sich eine Färbung bemerkbar (Unterschied von Schwefelwasserstoff); fügt man aber dann Kalilauge im Überschusse hinzu und erhitzt zum Sieden, so wird schwarzes Bleisulfid gefällt. Sehr empfindliche Probe.

2. Rhodanreaktion. Kocht man eine wässerige Lösung von Schwefelkohlenstoff einige Minuten mit starkem Ammoniak und wenig Alkohol, so entsteht neben Schwefelammonium Rhodanammonium; dampft man alsdann auf dem Wasserbade auf etwa 1 cm^3 ein und säuert mit Salzsäure an, so färbt sich die Lösung mit einem Tröpfchen Eisenchloridlösung rot. 0·05 *g* Schwefelkohlenstoff, die in 1 cm^3 Wasser gelöst sind, lassen sich mittelst dieser Probe noch sicher nachweisen.

3. Xanthogenreaktion. Schüttelt man einige Kubikzentimeter eines schwefelkohlenstoffhaltigen Destillates mit etwa dem dreifachen Volumen einer gesättigten Lösung von Ätzkali in absolutem Alkohol einige Minuten gut durch, säuert alsdann mit Essigsäure schwach an und fügt 1—2 Tropfen Kupfersulfatlösung hinzu, so entsteht zunächst ein braunschwarzer Niederschlag, der sich bald in gelbe Flocken von xanthogensaurem Kupferoxydul, $CS(SCu)(OC_2H_5)$, umwandelt.

Quantitative Bestimmung des Schwefelkohlenstoffdampfes in der Luft.

Durch Einatmen von schwefelkohlenstoffhaltiger Luft sind wiederholt schwere chronische Vergiftungen zustande gekommen, und zwar wurden bisher meist Arbeiter in Kautschukfabriken davon betroffen. Man hat daher von verschiedenen Seiten die Grenze zu ermitteln versucht, bei welcher der Gehalt der Luft an Schwefelkohlenstoff noch nicht schädigend auf die Gesundheit von Personen wirkt. Ein Gehalt von 0·5—0·8 *mg* Schwefelkohlenstoff im Liter der eingeatmeten Luft bleibt ohne schädliche Folgen.

ein solcher von 1·3 *mg* im Liter bereitet nach mehreren Stunden leichte Beschwerden. Bei 3·4 *mg* CS_2 im Liter stellen sich die Beschwerden nach etwa ½ Stunde und bei 6 *mg* schon nach 20 Minuten ein; 10 *mg* im Liter bewirken bereits Lähmungserscheinungen und mehrtätige Nachwirkungen. Nach den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen muß man die gerade noch schädliche Grenze für Personen, die sich oft wochenlang in einer Schwefelkohlenstoff enthaltenden Atmosphäre aufhalten müssen, auf unter 3 *mg* Schwefelkohlenstoff im Liter Luft ansetzen. Auf jeden Fall darf in Fabrikräumen, in welchen mit Schwefelkohlenstoff gearbeitet wird, dieser Höchstgehalt von 3 *mg* CS_2 im Liter Luft unter keinen Umständen überschritten werden. Da durch den Versuch festgestellt werden konnte, daß von dem eingeatmeten Gift 93—96% unverändert mit der Exspirationsluft wieder entweichen, so berechnet sich eine außerordentlich kleine Menge Schwefelkohlenstoff als Ursache der Vergiftungserscheinungen.

Ausführung der Bestimmung.

Die quantitative Bestimmung des Schwefelkohlenstoffdampfes in der Luft wird in der Weise ausgeführt, daß man 10—20 *l* der die Dämpfe enthaltenden Luft durch gesättigte alkoholische Kalilauge, die sich in einer *Péligot*schen Kugelröhre befindet, hindurchführt, wodurch der vorhandene Schwefelkohlenstoff quantitativ als xanthogensaures Kalium, $CS(SK)(OC_2H_5)$, gebunden wird. Nach beendigtem Durchleiten der Luft verdünnt man den Inhalt der *Péligot*schen Röhre mit 96%igem Alkohol auf ein bestimmtes Volumen, etwa auf 50 cm^3, mißt eine aliquote Menge hiervon ab, fügt Wasser hinzu, säuert mit Essigsäure schwach an, entfernt den Säureüberschuß mit Natriumbikarbonat und läßt, nach Zusatz von empfindlicher Stärkelösung, aus einer Bürette $\frac{1}{10}$ n-Jodlösung bis zur bleibenden Blaufärbung zufließen.

Das Jod führt das xanthogensaure Kalium nach der folgenden Gleichung (I) im wesentlichen in Äthylxanthogendisulfid über:

$$\text{I.}\quad J_2 + 2\,K\,S.CS.OC_2H_5 = 2\,KJ + \begin{array}{l} S.CS.OC_2H_5 \\ S.CS.OC_2H_5 \end{array}.$$

Nach *E. Rupp* und *L. Krauss*[1]) wirkt Jod auf xanthogensaures Kalium auch im Sinne der folgenden Gleichung (II) ein:

$$\text{II.}\quad J_2 + 2\,KS.CS.OC_2H_5 + H_2O = K_2CS_3 + 2\,C_2H_5.OH + 2\,HJ + S.$$

Wie aus diesen beiden Gleichungen ersichtlich ist, beanspruchen beide Reaktionen die gleiche Menge Jod, nämlich auf 2 Mol. Xanthogenat kommen je 2 Atome Jod. Das Jodbindungsvermögen wird also durch diesen Doppelprozeß in keiner Weise beeinflußt, so daß er sich zur quantitativen Ermittlung von Xanthogenaten verwerten läßt.

---

[1]) *E. Rupp* und *L. Krauss*, Die jodometrische Bestimmung des Kupfers als Kuproxanthogenat. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. 35, 4157 (1902).

Unter Berücksichtigung der aufgestellten Gleichungen entsprechen 1000 cm^3 $\frac{1}{10}$ n-Jodlösung. $\frac{1}{10}$ CS_2 g = 7·6 g Schwefelkohlenstoff.

Äthylalkohol.

Der Alkohol, C_2H_5OH, wird von den verschiedensten Applikationsstellen aus rasch aufgenommen, besonders leicht vom nüchternen Magen aus. Von hier aus wird er reichlich resorbiert, während eine Resorption von nicht flüchtigen, wässerigen Flüssigkeiten vom Magen aus sonst so gut wie nicht erfolgt. Der resorbierte Alkohol gelangt ins Blut und verteilt sich an alle Organe (vgl. Chloralhydrat). Nach Versuchen an Hunden, Füllen und erwachsenen Pferden beträgt der Gehalt des Blutes an Alkohol bei tiefster Narkose 0·72%; aber schon bei einem Gehalte von 0·12% ist Benommenheit vorhanden. Die Ansicht der Toxikologen geht auseinander in der Frage, ob bei einer akuten Alkoholvergiftung die Verteilung des Alkohols im Körper eine gleichmäßige sei oder ob der Alkoholgehalt des Gehirns größer sei als der der anderen Organe. Die letztere Annahme findet durch die chemische Analyse der Organe eines an akuter Alkoholvergiftung gestorbenen Mannes eine Stütze. Die Leber dieses Mannes enthielt 0·21%, das Gehirn 0·47% und das Blut 0·33% Alkohol. Diese Zahlen werden nur verständlich, wenn man annimmt, daß das Gehirn den Alkohol bindet. Aber auch die roten Blutkörperchen binden den Alkohol gerade so wie andere Narkotika.

Die Unsicherheit, die früher über das weitere Schicksal des Alkohols im tierischen Organismus bestanden hat, ist jetzt durch eine Reihe eingehender Untersuchungen endgültig geklärt. Diese Untersuchungen haben ergeben, daß durch die Haut gar nichts, durch die Niere höchstens 1—1·5% und durch die Lunge 1·6—2% des aufgenommenen Alkohols unverändert weggehen. *Strassmann* fand die Ausscheidung durch die Lunge etwas höher, zu 5—6%, die durch die Niere zu 1·0—2·5%. Die ganze übrige Alkoholmenge wird im menschlichen Organismus verbrannt, also zu Kohlensäure und Wasser oxydiert.

B. Fischer fand in den Leichenteilen eines Mannes, der höchstwahrscheinlich infolge Genusses allzu großer Mengen Branntweins gestorben war, die folgenden Mengen Alkohol:

in 2720 g Magen und Darminhalt	30·6 g	Alkohol
„ 2070 g Herz, Lunge, Blut	10·9 g	„
„ 1820 g Leber, Niere	7·8 g	„
„ 1365 g Gehirn	4·8 g	„

Nachweis des Äthylalkohols.

Der Äthylalkohol geht mit Wasserdämpfen leicht über und findet sich daher in den ersten Anteilen des aufgesammelten Destillats vor. Falls nicht sehr geringe Mengen vorliegen, gibt sich der Alkohol im Destillate durch seinen Geruch zu erkennen. Mit dem Destillate führe man die folgenden Reaktionen aus:

1. Die *Lieben*sche Jodoformprobe.[1] Man erwärmt das Destillat gelinde, auf etwa 40—50°, fügt einige Kubikzentimeter wässerige Jod-Jodkaliumlösung oder ein Kriställchen Jod sowie soviel Kalilauge hinzu, daß die Flüssigkeit noch deutlich gelb bis schwach bräunlich gefärbt erscheint; bei Vorhandensein von Alkohol scheidet sich sofort oder während des Erkaltens ein gelblichweißer oder zitronengelber Niederschlag von Jodoform aus. Bei Spuren von Alkohol erfolgt die Ausscheidung des Jodoforms erst bei längerem Stehen. Besonders das sich langsam ausscheidende Jodoform kristallisiert schön in sechsseitigen Täfelchen und sechsstrahligen Sternen.

Bemerkungen. Die *Lieben*sche Jodoformprobe ist zwar sehr empfindlich, aber für Äthylalkohol nicht charakteristisch, denn auch andere primäre Alkohole, ausgenommen der Methylalkohol, sowie manche sekundäre Alkohole, ferner Aldehyde, Ketone, Essigäther, Azetessigester, Milchsäure u. a. geben mit Jod und Kalilauge ebenfalls Jodoform.

2. Die *Berthelot*sche Probe. Man schüttelt das Destillat mit einigen Tropfen Benzoylchlorid ($C_6H_5.CO.Cl$) und überschüssiger $10^0/_0$iger Natronlauge bis zum Verschwinden des stechenden Geruchs des Benzoylchlorids tüchtig durch; enthält das Destillat Äthylalkohol, so macht sich jetzt der aromatische Geruch des Benzoesäureäthylesters bemerkbar. 10 *cm*³ eines $0{\cdot}5^0/_0$igen Weingeist lassen hierbei noch deutlich den Estergeruch erkennen.

3. Die Chromsäureprobe. Erwärmt man eine alkoholhaltige Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure und 1—2 Tröpfchen einer sehr stark verdünnten Kaliumchromatlösung, so geht die ursprünglich gelbrote Farbe des Gemisches in Grün über und gleichzeitig macht sich ein Geruch nach Azetaldehyd bemerkbar. Diese Probe ist nicht eindeutig, da außer Weingeist viele andere organische Substanzen, welche flüchtig und oxydierbar sind, die Chromsäure ebenfalls reduzieren.

4. Essigesterprobe. Erhitzt man ein Gemisch aus gleichen Volumen weingeisthaltiger Flüssigkeit und konzentrierter Schwefelsäure mit einer Spur festen Natriumazetats, so macht sich der Geruch nach Essigsäureäthylester bemerkbar.

5. *Vitali*sche Reaktion. Man läßt einige Kubikzentimeter des fraglichen Destillats in einem Schälchen mit einem Stückchen festem Ätzkali und 3 Tröpfchen Schwefelkohlenstoff kalt stehen. Ist der überschüssige Schwefelkohlenstoff größtenteils verdunstet, so fügt man einen Tropfen Ammoniummolybdatlösung (1 : 10) hinzu und säuert mit verdünnter Schwefelsäure stark an. War das Destillat alkoholhaltig, so tritt jetzt eine Rotfärbung des Gemisches auf. Bei dieser Probe wird zuerst xanthogensaures Kalium, $SC(OC_2H_5)(SK)$, gebildet, das dann mit dem Ammoniummolybdat die Rotfärbung gibt. $5^0/_0$iger Alkohol gibt die Probe noch recht schön. — Azetaldehyd und Azeton geben eine ähnliche Färbung.

[1] *Adolf Lieben*, Über Entstehung von Jodoform und Anwendung dieser Reaktion in der chemischen Analyse. *Liebigs* Ann. d. Chemie. Supplementbd. 7. 218 (1870).

II. Die Untersuchung auf solche organische Stoffe, die aus saurer Lösung mit Wasserdämpfen nicht flüchtig sind.

Ein Teil der ursprünglichen, zur Untersuchung vorliegenden Substanz wird zuerst gehörig zerkleinert, dann in einem geräumigen Kolben mit dem doppelten bis dreifachen Volumen absolutem Alkohol innig gemischt und mit so viel Weinsäurelösung versetzt, daß die Mischung nach dem Umschütteln deutlich sauer reagiert. Man vermeide einen größeren Überschuß von Weinsäure, da diese Säure aus wässeriger Lösung in Äther übergeht und somit die Giftstoffe des Ätherauszuges der sauren Lösung zu sehr verunreinigen könnte. Der betreffende Kolben wird mit einem zum Rückfluß dienenden Kühlrohr (0·8—1 *m* lang) versehen und auf dem Wasserbade unter häufigem Umschütteln 10—15 Minuten lang erhitzt. Hat man größere Mengen von Leichenteilen mit angesäuertem Alkohol auszuziehen, so verbindet man den die Leichenteile enthaltenden Glaskolben mit einem senkrecht stehenden *Liebig*schen Kühler, der als Rückflußkühler dient. Der Inhalt des Kolbens wird erst nach dem Erkalten abfiltriert, damit etwa vorhandenes Fett sich möglichst vollständig abscheidet. Der Rückstand auf dem Filter wird mit Alkohol ausgewaschen und das erhaltene Filtrat, das sauer reagieren muß, in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade zum dünnen Sirup eingedunstet; diesen durchrührt man, je nach der Menge Rückstand, mit 100—200 cm^3 und mehr kaltem Wasser, wobei fast immer, besonders bei der Untersuchung von Leichenteilen, Fett und harzige Stoffe in reichlicher Menge ausgeschieden werden; die letzteren filtriert man ab und dunstet das Filtrat auf dem Wasserbade wiederum zum dünnen Sirup ein, der nun mit absolutem Alkohol gut verrührt wird; hierbei bleibt meist eine zähe oder schleimige, mit der Zeit häufig pulverig werdende, weißliche Masse ungelöst, die aus Eiweißstoffen, Albumosen (Pepton), dextrinartigen Stoffen, zum Teil auch aus anorganischen Salzen bestehen kann, während die weinsauren Alkaloide und die anderen organischen Giftstoffe sowie die künstlichen stark wirkenden Arzneistoffe in Lösung gehen. Je mehr absoluter Alkohol hierbei genommen wird, desto vollständiger ist die Ausfällung derartiger Stoffe, die den sicheren Nachweis der organischen Gifte mehr oder weniger stören. Die abfiltrierte alkoholische Flüssigkeit wird wiederum auf dem Wasserbade eingedampft, der bleibende Rückstand in etwa 50 cm^3 Wasser gelöst und die hierbei erhaltene Lösung, falls sie nicht ganz klar sein sollte, nochmals durch ein angefeuchtetes Filterchen gegossen.

Auf diese Weise erhält man eine wässerige, sauer reagierende Lösung der weinsauren Alkaloide und der anderen, hierher gehörenden, stark wirkenden organischen Stoffe, eine Lösung, die von Eiweißstoffen, Albumosen, Fett, harzigen Stoffen und von Farbstoffen nahezu frei ist. Diese Lösung eignet sich vorzüglich für die Untersuchung auf organische

Gifte nach dem Verfahren von *Stas-Otto.*[1]) Man verwende stets die größte Sorgfalt auf die Herstellung dieser wässerigen, weinsauren Lösung und sei ferner bestrebt, die Alkaloide und die anderen hierher gehörenden Stoffe im möglichst reinen Zustande abzuscheiden, denn nur die reinen Stoffe geben eindeutige, einwandsfreie Reaktionen, welche dann sichere Schlüsse zulassen.

Die Untersuchung von Bier, Wein, Kaffee, Tee und anderen Flüssigkeiten.

Bei Bier, Wein, schwarzem Kaffee oder Teeaufguß, also bei Genußmitteln, welche dem Gerichtschemiker häufig als Überführungsstücke zur Prüfung auf einen Giftgehalt vorgelegt werden, kann das oben angegebene Verfahren wesentlich abgekürzt werden. In einem solchen Falle wird das betreffende Untersuchungsmaterial, nötigenfalls erst mit wässeriger Weinsäurelösung angesäuert, in einer flachen Schale auf dem Wasserbade eingedunstet, der Rückstand mit absolutem Alkohol gut durchrührt und abfiltriert. Das Filtrat wird wiederum auf dem Wasserbade eingedunstet oder, falls größere Mengen zu verarbeiten sind, wird der Alkohol aus dem Filtrate abdestilliert und der hierbei bleibende Rückstand in lauwarmem Wasser gelöst. Die so erhaltene wässerige, weinsaure, nötigenfalls filtrierte Lösung wird nach dem Verfahren von *Stas-Otto* untersucht.

Verfahren von Stas-Otto.

A. Die Untersuchung des Ätherauszuges der wässerigen, weinsauren Lösung.

Man schüttelt die nach den obigen Angaben hergestellte wässerige, weinsaure Lösung in einem Scheidetrichter mit nicht ganz der gleichen Menge Äther einige Male tüchtig durch, läßt absitzen und trennt dann die Ätherschicht von der wässerigen Flüssigkeit. Die letztere zieht man noch ein zweites und drittes Mal mit neuen Mengen Äther aus, um die aus saurer Lösung in Äther übergehenden Stoffe möglichst vollständig in dieses Lösungsmittel überzuführen. Die sämtlichen Ätherauszüge vereinigt man und läßt sie in einer trockenen Kochflasche 1—2 Stunden ruhig absetzen, wobei sich meist noch einige Tropfen wässeriger Flüssigkeit abscheiden. Die durch ein trockenes Filter abgegossene Ätherlösung läßt man auf einer nicht zu großen Uhrschale, von etwa 8—10 *cm* Durchmesser, bei gelinder Wärme auf einem vorher erwärmten Wasserbade (Flamme auslöschen!) langsam eindunsten und untersucht einen Rückstand, der hierbei bleibt, nach den unten gemachten Angaben auf einen Gehalt an Giftstoffen. Man arbeitet am besten in der Weise, daß man die Uhrschale

[1]) *Stas*, Über die Auffindung und Erkennung organischer Basen in Vergiftungsfällen. Ann. d. Chem. u. Pharm. 84, 379 (1852).

auf das warme Wasserbad stellt und den filtrierten Ätherauszug in dem Maße darauf tropfen läßt, als der Äther verdunstet. Auf diese Weise kann man selbst eine größere Menge der Ätherlösung auf einer verhältnismäßig kleinen Uhrschale verdunsten, was noch den Vorteil hat, daß der meist an und für sich schon geringe Verdunstungsrückstand für die einzelnen Reaktionen leichter und vollständiger von der Schale losgelöst werden kann, als wenn er auf einer großen Uhrschale verteilt ist.

Ein Rückstand, der beim Eindunsten des Ätherauszuges der wässerigen weinsauren Lösung bleibt, kann alle diejenigen stark wirkenden Stoffe enthalten, welche in Äther löslich sind und welche keinen ausgesprochenen basischen Charakter haben. Schwächere Basen, wie Antipyrin, Coffein und Narkotin lassen sich aus wässeriger weinsaurer Lösung wenigstens zum Teil mit Äther ausschütteln. Von bekannteren giftig wirkenden Stoffen können in dem Verdunstungsrückstande der Ätherlösung die folgenden Substanzen vorhanden sein:

Pikrotoxin	Acetanilid
Colchicin	Phenacetin
Cantharidin	Salicylsäure
Pikrinsäure	Veronal.

Die basischen Substanzen Antipyrin und Coffein finden sich nur in Spuren im Ätherauszuge der weinsauren Lösung vor; die größte Menge derselben geht in den Äther- oder Chloroformauszug der mit Natronlauge oder Ammoniak alkalisch gemachten Flüssigkeit über. Ebenso findet sich Colchicin hauptsächlich im Chloroformauszuge der mit Ammoniak alkalisch gemachten Flüssigkeit vor.

Auch wenn von den vorgezeichneten Stoffen nicht einmal Spuren vorhanden sind, hinterläßt der Ätherauszug der weinsauren Lösung meist einen mehr oder weniger bedeutenden, meist schmierigen Rückstand, der aus Weinsäure, Milchsäure, aber auch aus fettigen, harzigen und färbenden Substanzen bestehen kann. Wenigstens trifft dies für die Untersuchung von Leichenteilen meist zu. Auch manche Metallsalze, insbesondere Quecksilbercyanid[1]) und Quecksilberchlorid gehen aus der wässerigen Lösung teilweise in Äther über.

Von dem erhaltenen Ätherrückstande bestimmt man das Aussehen, unter Umständen auch den Geschmack, weil man hieraus oft mit großer Sicherheit sowohl auf das Vorhandensein, als auch besonders auf die Ab-

[1]) Quecksilbercyanid geht aus weinsaurer, nicht zu verdünnter Lösung zum Teil in Äther über; z. B. werden aus 100 cm^3 einer 0·1%igen Quecksilbercyanidlösung durch Äther nachweisbare Mengen des Cyanids ausgeschüttelt; die Extraktion ist aber keine vollständige, denn die nach fünfmaliger Ausschüttlung mit Äther bleibende wässerige Flüssigkeit gibt noch starke Quecksilberreaktion. Aus einer 0·01%igen Lösung entzieht Äther keine Spur Quecksilbercyanid. Zum Nachweis des Cyanids versetzt man den Ätherrückstand mit Schwefelammonium: Quecksilbersulfid wird gefällt und die abfiltrierte Flüssigkeit enthält Rhodanammonium. (Siehe unter Blausäure.)

wesenheit bestimmter Stoffe schließen kann. Ein stark bitter schmeckender Rückstand wird in erster Linie auf Pikrotoxin sowie Colchicin und, falls er intensiv gelb gefärbt ist, auch auf Pikrinsäure eingehender geprüft. Auch Veronal schmeckt bitter, ist aber farblos. Schmeckt ein Rückstand nicht bitter, so kann man schon zum voraus mit einem hohen Grade von Wahrscheinlichkeit angeben, daß die erwähnten stark bitter schmeckenden Stoffe im Untersuchungsmaterial nicht vorhanden sind. Man wird dann den aus dem Ätherauszuge erhaltenen Rückstand vorzugsweise auf Acetanilid, Antipyrin, Phenacetin, Salizylsäure und andere hierher gehörige, nicht bitter schmeckende Stoffe untersuchen. Salizylsäure zeigt einen charakteristischen süßlichsauren, etwas kratzenden Geschmack.

Pikrotoxin.

Pikrotoxin, $C_{30}H_{34}O_{13}$, der giftige Bestandteil der Kokkelskörner, der Früchte von Menispermum Cocculus, kristallisiert aus heißem Wasser in langen farblosen, bei 199—200° schmelzenden Nadeln, die in kaltem Wasser ziemlich schwer, in kochendem Wasser sowie in Alkohol leichter löslich sind; von Äther wird es nur wenig, von Chloroform, Amylalkohol und Eisessig aber reichlich gelöst. Die alkoholische Lösung reagiert neutral und ist linksdrehend. Pikrotoxin schmeckt stark bitter. — Von Säuren wird es nicht reichlicher gelöst als von reinem Wasser, wohl aber von Kalilauge, Natronlauge und wässeriger Ammoniakflüssigkeit, und zwar zu nicht kristallisierenden, unbeständigen, salzartigen Verbindungen. Starken Basen gegenüber verhält sich also das Pikrotoxin wie eine schwache Säure. Pikrotoxin wird schon durch Kochen mit der 20fachen Menge Benzol in Pikrotoxinin und Pikrotin gespalten, wobei das erstere in Lösung geht, während das Pikrotin ungelöst bleibt:

$$\underset{\text{Pikrotoxin}}{C_{30}H_{34}O_{13}} = \underset{\text{Pikrotoxinin}}{C_{15}H_{16}O_6} + \underset{\text{Pikrotin.}}{C_{15}H_{18}O_7}$$

Noch leichter erfolgt diese Spaltung des Pikrotoxins durch Chloroform.

Werden umgekehrt Pikrotoxinin und Pikrotin in molekularem Verhältnisse in heißem Wasser gelöst, so kristallisiert beim Erkalten wieder Pikrotoxin aus. Wird Pikrotoxin direkt oder in wässeriger oder ätherischer Lösung mit Brom behandelt, so wird es zunächst ebenfalls in Pikrotoxinin und Pikrotin gespalten, nur wird das erstere sofort in Monobrompikrotoxinin, $C_{15}H_{15}BrO_6$, verwandelt, während das letztere fast unverändert bleibt. Mit Zinkstaub und Essigsäure kann das in Wasser schwer lösliche Monobrompikrotoxinin wieder zu Pikrotoxinin reduziert werden. Pikrotoxinin wirkt stark giftig, während Pikrotin nahezu ungiftig ist. Pikrotoxin ist ein starkes Krampfgift, das in seiner Wirkung zwischen Cikutoxin und Strychnin stehen dürfte.

Nach *R. Meyer* und *P. Bruger*[1]) ist Pikrotoxin keine atomistisch konstituierte chemische Verbindung, sondern ein Komplex der beiden.

[1]) *R. J. Meyer* und *P. Bruger*, Zur Kenntnis des Pikrotoxins. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. 31. 2958 (1898).

in bestimmtem, aber nicht molekularen Verhältnis zusammen kristallisierenden Verbindungen Pikrotin und Pikrotoxinin.

Reaktionen des Pikrotoxins.

1. Probe mit *Fehling*scher Lösung. Löst man in einem Probierröhrlein Pikrotoxin in 10—20 Tropfen sehr stark verdünnter Natronlauge, fügt einige Tropfen *Fehling*sche Lösung[1]) hinzu und erwärmt vorsichtig, ohne umzuschütteln, mit kleiner Flamme, so trübt sich das Gemisch, und es scheidet sich allmählich ein gelbroter oder roter Niederschlag von Kupferoxydul aus. — Löst sich der Verdampfungsrückstand von der Ätherlösung — von dem man nicht zu wenig nehme — in der verdünnten Natronlauge nicht vollkommen klar auf, so gieße man die Lösung durch ein angefeuchtetes Filterchen und untersuche das klare Filtrat mit *Fehling*scher Lösung.

2. Probe mit ammoniakalischer Silberlösung. Pikrotoxin reduziert beim Kochen eine mit überschüssigem Ammoniak versetzte Silbernitratlösung unter Bildung eines schwarzen Niederschlages von metallischem Silber; sind nur Spuren von Pikrotoxin vorhanden, so tritt eine mehr bräunliche Färbung auf.

3. Pikrotoxin färbt sich mit wenig konzentrierter Schwefelsäure orangerot und geht beim Umrühren mit rötlichgelber oder gelber Farbe in Lösung. Läßt man in diese Lösung einen Tropfen einer Kaliumdichromatlösung hineinfallen, so umrändert sich der Tropfen schön rotbraun und das ganze Gemisch nimmt infolge Vermischung der beiden Flüssigkeiten alsbald eine schmutzigbraune Färbung an, die schließlich bei längerem Stehen in Grün übergeht.

Erhält man bei dieser Probe nur die grüne Färbung, so beweist diese nichts, denn es gibt viele organische Substanzen, welche Chromsäure zu Chromoxyd reduzieren und infolgedessen eine Grünfärbung des Gemisches verursachen.

4. Reaktion von *Melzer*.[2]) Übergießt man in einem Uhrschälchen Pikrotoxin mit 1—2 Tropfen einer Mischung aus Benzaldehyd und absolutem Alkohol und gibt vorsichtig 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zu, so färbt sich das Pikrotoxin deutlich rot. Bewegt man das Schälchen hin und her, so ziehen sich vom Pikrotoxin aus rote Streifen durch die Flüssigkeit.

Man verwende für diese Probe eine frisch bereitete, 20%ige Lösung von Benzaldehyd in absolutem Alkohol; da nämlich Benzaldehyd schon mit Schwefelsäure allein eine gelbbraune Färbung gibt, verdünnt man ersteren mit Alkohol, um diese mehr oder weniger störende Färbung möglichst abzuschwächen. Alsdann erscheint das Gemisch hellgelb gefärbt, so daß sich in ihm die dunkelroten Farbentöne, welche das Pikrotoxin hervorruft, sehr schön abheben. Die rote Färbung des Pikrotoxins ist wenig beständig; sie geht vom Rande aus allmählich in Blaßrot oder Violett über. —

---

[1]) Die für diese Reaktion verwendete *Fehling*sche Lösung darf kein Kupferoxydul abscheiden, wenn sie für sich erhitzt wird.

[2]) *H. Melzer*, Beiträge zur forensischen Chemie. Zeitschr. f. analyt. Chem. **37**. 351 und 747 (1898).

H. Kreis[1]) hat gefunden, daß Cholestearin und die Phytostearine mit dem *Melzer*schen Reagens ähnliche Färbungen geben wie das Pikrotoxin. Veratrin gibt eine Rotfärbung wie mit konzentrierter Schwefelsäure allein. Morphin gibt schön rote bis gelbrote Streifen bzw. solche Färbungen.

5. Reaktion von *Langley*. Mischt man Pikrotoxin mit etwa der dreifachen Menge Salpeter und durchfeuchtet das Gemisch mit konzentrierter Schwefelsäure, so färbt es sich mit überschüssiger konzentrierter Natronlauge intensiv rot. Man befeuchte hierbei das Pikrotoxin-Salpetergemisch mit möglichst wenig konzentrierter Schwefelsäure.

Colchicin.

Colchicin, $C_{22}H_{25}NO_6$, ein in allen Teilen der Herbstzeitlose, Colchicum autumnale, sich vorfindendes Alkaloid, bildet ein gelbliches, amorphes, sehr stark bitter schmeckendes, stark giftig wirkendes Pulver, das sich in Wasser, Alkohol und Chloroform leicht, in Äther und Benzol weniger leicht und in Petroläther fast gar nicht löst. Die gelblich gefärbten Lösungen des Colchicins besitzen nur sehr schwach basische Eigenschaften; Colchicin läßt sich infolgedessen aus seiner wässerigen, weinsauren Lösung mit Äther, besser mit Chloroform ausschütteln. Es kann aber der sauren Lösung nicht mit Benzol oder Petroläther entzogen werden. Beim Eindunsten der Lösungen in Chloroform oder Äther hinterbleibt Colchicin als eine gelbliche, meist harz- oder firnisartige Masse von klebriger Beschaffenheit. Vollständiger ist die Extraktion des Colchicins, wenn es einer mit Ammoniak alkalisch gemachten wässerigen Lösung mit Chloroform entzogen wird.

Beim Kochen mit schwefelsäurehaltigem Wasser wird Colchicin in Colchicein und Methylalkohol hydrolytisch gespalten.

Die gleiche Spaltung erfolgt bei $1^1/_2$—2 Stunden langem Kochen des Alkaloids mit 60 Teilen 1%iger Salzsäure:

$$\underset{\text{Colchicin}}{C_{22}H_{25}NO_6} + H_2O = \underset{\text{Colchicein}}{C_{21}H_{23}NO_6} + \underset{\text{Methylalkohol.}}{CH_3OH}$$

Umgekehrt entsteht aus Colchicein beim Erhitzen mit Natriummethylat und Methyljodid auf 100° wieder Colchicin. Aus dem Colchicein werden durch Jodwasserstoffsäure drei Moleküle Methyljodid abgespalten, wodurch bewiesen ist, daß im Colchiceinmolekül, somit auch im Colchicin drei Methoxylgruppen enthalten sind. Durch Erhitzen mit starker Salzsäure geht das Colchicein unter Abspaltung von Essigsäure in Trimethylcolchicinsäure über; durch dieses Verhalten ist im Colchicein und Colchicin eine Acetylgruppe (CH_3CO) nachgewiesen. Die Formel des Colchicins, d. i. des Methylcolchiceins, läßt sich demnach in der folgenden Weise auflösen:

$$(CH_3O)_3C_{15}H_9{<}^{NH.CO.CH_3}_{COOCH_3}.$$

---

[1]) *Hans Kreis*, Zur Kenntnis der *Melzer*schen Pikrotoxinreaktion. Chemiker-Ztg. **23**. 21 (1899).

Reaktionen des Colchicins.

Die wässerigen Colchicinlösungen und besonders die Lösungen des Colchicins in verdünnten Mineralsäuren sind gelb gefärbt. Versetzt man eine wässerige, kaum gefärbte Colchicinlösung mit einigen Tropfen verdünnter Salz- oder Schwefelsäure, so färbt sie sich mehr oder weniger intensiv gelb. Zeigt der Verdunstungsrückstand der Ätherlösung dieses Verhalten nicht, so wird auch Colchicin nicht zugegen sein.

1. Gerbsäurelösung fällt aus den nicht zu verdünnten, wässerigen Colchicinlösungen einen weißen, flockigen Niederschlag. Selbstverständlich ist diese Probe für Colchicin nicht charakteristisch.

2. Konzentrierte Salpetersäure von 1·4 spezifischem Gewicht löst Colchicin mit schmutzigvioletter Farbe auf, die beim Umrühren alsbald in Braunrot und schließlich in Gelb übergeht. Versetzt man die gelb gewordene Löung mit verdünnter Natron- oder Kalilauge bis zur alkalischen Reaktion, so färbt sie sich schön orangegelb oder orangerot.

3. Konzentrierte Schwefelsäure löst Colchicin mit intensiv gelber Farbe auf; fügt man zu dieser Lösung einen Tropfen Salpetersäure, so färbt sie sich grün, blau, violett und schließlich blaßgelb. Ist die letztere Färbung eingetreten, so ruft auch hier überschüssige Kalilauge eine orangerote Färbung hervor. *Erdmanns* Reagens löst Colchicin mit blauer bis violetter Farbe.

4. Konzentrierte Salzsäure löst Colchicin mit intensiv gelber Farbe auf; versetzt man diese Lösung mit 2 Tröpfchen Eisenchloridlösung und kocht sie in einem Probierröhrchen 2—3 Minuten lang, so färbt sie sich dunkler und nimmt beim Erkalten, besonders aber beim Verdünnen mit etwa der gleichen Menge Wasser, eine schön grüne oder mehr olivgrüne Färbung an. Schüttelt man alsdann mit einigen Tropfen Chloroform aus, so färbt sich dieses gelbbraun oder granatrot, während die wässerige Flüssigkeit ihre grüne Färbung beibehält. — Reaktion von *Zeisel.*

Reinigung des Colchicins vom Verdunstungsrückstande des Äther- oder Chloroformauszuges.

Um das Colchicin aus dem gelb gefärbten Verdunstungsrückstande möglichst rein zu erhalten, zieht man diesen mit warmem Wasser aus, schüttelt die erkaltete, filtrierte Flüssigkeit zuerst mit Petroläther, der nur fettige, harzige und färbende Verunreinigungen, aber kein Colchicin aufnimmt, und alsdann mit Chloroform aus. Oder man fällt das Colchicin aus der wässerigen, nicht zu verdünnten Lösung mit Gerbsäure, wäscht den abfiltrierten Niederschlag mit kaltem Wasser aus, mischt ihn noch feucht mit frisch gefälltem, ausgewaschenem Bleihydroxyd und zieht die eingetrocknete und gepulverte Masse mit Chloroform aus. Letzteres hinterläßt dann beim Eindunsten das Colchicin in nahezu reinem Zustande, nämlich als gelbe, firnisartige Masse, welche die Reaktionen des Colchicins schön gibt.

Cantharidin.

Cantharidin, $C_{10}H_{12}O_4$, ist die wirksame, blasenziehende Substanz der spanischen Fliege (Lytta vesicatoria), welche 0·8—1% davon

enthält. Cantharidin bildet farblose, glänzende, neutral reagierende, rhombische Blättchen, die bei 218° schmelzen und bei stärkerem Erhitzen in weißen Nädelchen sublimieren. In Wasser, selbst kochendem, ist es fast unlöslich; Säuren, wie Weinsäure, erhöhen seine Löslichkeit in Wasser, obgleich Cantharidin keine Base ist. Auch in kaltem Alkohol (0·03 : 100 bei 18°) und in Äther (0·11 : 100) ist Cantharidin schwer löslich; am reichlichsten wird es von Chloroform (1·52 : 100), Azeton und Essigäther gelöst. In dem offiziellen Petroleumbenzin ist es so gut wie unlöslich.

Nachweis des Cantharidins.

Viel Feuchtigkeit enthaltendes Untersuchungsmaterial, wie Teile von Organen, z. B. Magen und Darm samt Inhalt, verdampft man erst auf dem Wasserbade möglichst vollständig zur Trockne, kocht nun nach *Dragendorff* den trockenen und möglichst zerkleinerten Rückstand mit schwefelsäurehaltigem Alkohol wiederholt aus, versetzt die abfiltrierten Auszüge mit etwa $^1/_6$ Volumen Wasser und destilliert den Alkohol aus ihnen ab. Den Destillationsrückstand zieht man 2—3mal mit Chloroform aus, schüttelt die vereinigten Chloroformauszüge zur Entfernung von etwa anhaftender Säure mit Wasser aus und destilliert aus ihnen das Chloroform ab, nachdem man die wässerige Schicht in einem Scheidetrichter entfernt hat. In dem Rückstand, der hierbei bleibt, ist das Cantharidin nachzuweisen. Da Cantharidin keine charakteristischen chemischen Reaktionen hat, muß man zu seiner Identifizierung den physiologischen Versuch anstellen. Falls der erhaltene Chloroformrückstand nicht schon Fettsubstanz enthält, löst man ihn in einigen Tropfen heißem Mandelöl auf, tränkt mit dieser Lösung ein Stückchen Leinwand und befestigt dieses mit Hilfe von Heftpflaster auf dem Oberarm oder der Brust. Ist der erhaltene Rückstand cantharidinhaltig, so tritt jetzt Rötung der Haut, unter Umständen auch Pustel- oder Bäschenbildung auf derselben ein. 0·00014 *g* Cantharidin ruft noch Bläschenbildung hervor. Auch die cantharidinsauren Salze wirken blasenbildend.

Will man im Blut, Gehirn, in der Leber und in anderem proteinreichem Material Cantharidin nachweisen, so kocht man das Untersuchungsmaterial mit verdünnter Kalilauge (1 *g* KOH auf 15 cm^3 Wasser) so lange aus, bis eine gleichartige Masse entstanden ist, säuert hierauf mit verdünnter Schwefelsäure an, kocht mit Alkohol tüchtig aus, versetzt die abfiltrierten Auszüge mit etwa $^1/_6$ Volumen Wasser und verfährt im übrigen nach den obigen Angaben *(E. Schmidt)*.

Cantharidin soll gegen Fäulnis beständig sein.

Pikrinsäure.

Pikrinsäure oder 2, 4, 6-Trinitrophenol, $C_6H_2(NO_2)_3OH$, kristallisiert aus Wasser in hellgelben Blättern, aus Äther in zitronengelben Säulen, schmilzt bei 122·5°, ist in kaltem Wasser ziemlich schwer, in heißem Wasser sowie in Alkohol, Äther und Benzol aber leicht löslich.

Die wässerige Lösung der Pikrinsäure reagiert sauer, schmeckt sehr stark bitter und färbt tierische Faser echt gelb. Pikrinsäure ist ein ziemlich stark wirkendes Gift, das innerlich eingenommen eine auffallende Gelbfärbung erst der Konjunktiva, dann der gesamten Haut bewirkt, eine Erscheinung, die man als Pikrinsäureikterus zu bezeichnen pflegt. Wie die meisten Nitrokörper zersetzt auch die Pikrinsäure und ihre Salze die roten Blutkörperchen unter Bildung von Methämoglobin. Pikrinsäure ist also ein Blutgift; ferner wirkt sie als ein Krampfgift, indem sie durch Reizung des Zentralnervensystems Krämpfe hervorruft. Eine dritte Wirkung beruht darauf, daß die Pikrinsäure in saurer Lösung ein starkes Fällungsvermögen für Eiweiß besitzt, was sich besonders in denjenigen Organen des Körpers, wo saure Reaktion auftritt, nämlich im Magen und in der Niere, durch nekrotische Gewebsveränderungen bemerkbar macht. Im Organismus wird Pikrinsäure zu Pikraminsäure, $C_6H_2(NO_2)_2(NH_2)OH$, reduziert, die weniger Eiweiß fällend wirkt. Der Körper entgiftet sich also dadurch, daß er die Pikrinsäure umwandelt. Infolge der Bildung der Pikraminsäure ist der Harn bei Pikrinsäurevergiftung hochrot gefärbt. Ein Teil der Pikrinsäure geht unverändert in den Harn über. Die Ausscheidung erfolgt langsam; bei einem in der Literatur beschriebenen Falle (vgl. *R. Kobert*, Intoxikationen) dauerte die Ausscheidung im Harn sechs Tage, nachdem 1 *g* Pikrinsäure auf einmal eingenommen wurde. Der Harn war rubinrot gefärbt, klar, sauer, frei von Eiweiß und Gallenbestandteilen. Auch im Kot ließ sich Pikrinsäure reichlich nachweisen.

Nachweis der Pikrinsäure.

Bei Gegenwart von Pikrinsäure ist das Untersuchungsmaterial mehr oder weniger gelb oder gelbgrün gefärbt: auch die wässerigen und alkoholischen Auszüge sowie die Ätherlösung zeigen die gleiche Färbung. Sind irgend welche Leichenteile zu untersuchen, so kocht man sie nach dem Zerkleinern mehrere Stunden unter Rückfluß mit salzsäurehaltigem Alkohol aus, um die Eiweißverbindungen der Pikrinsäure möglichst vollständig zu zersetzen und die Pikrinsäure in Lösung zu bringen. Die abfiltrierten alkoholischen Auszüge werden auf dem Wasserbade eingedampft, die gelb, gelbgrün oder manchmal auch gelbrot oder rotbraun gefärbten Rückstände mit warmem Wasser behandelt und die Auszüge abfiltriert. Das Filtrat wird entweder direkt auf Pikrinsäure geprüft, oder es wird in der üblichen Weise mit nicht zu geringen Mengen Äther wiederholt ausgeschüttelt. Im Verdunstungsrückstand dieses Ätherauszuges sucht man die Pikrinsäure durch die folgenden Reaktionen nachzuweisen:

1. Isopurpursäurereaktion. Eine wässerige Pikrinsäurelösung färbt sich bei gelindem Erwärmen, auf etwa 50—60°, mit einigen Tropfen einer gesättigten wässerigen Cyankaliumlösung (1:2) durch entstandenes isopurpursaures Kalium tief rot. Eine Lösung von 1 *mg* Pikrinsäure in 5 cm^3 Wasser, also Verdünnung 1:50000, färbt sich hierbei noch stark rot.

2. Pikraminsäurereaktion. *a)* Erwärmt man eine Pikrinsäurelösung mit je 1—2 Tropfen Natronlauge und Traubenzuckerlösung, so färbt sie sich dunkelrot. Ein Überschuß von Natronlauge muß vermieden werden, weil diese mit Traubenzuckerlösung allein eine ähnliche Färbung hervorrufen könnte. *b)* Oder man erwärmt die Pikrinsäurelösung mit einigen Tropfen Natronlauge und Schwefelammonium, wobei sie sich ebenfalls rot färbt.

In beiden Fällen (*a* und *b*) wird die Pikrinsäure zu Pikraminsäure, dem 4,6-Dinitro-2-Aminophenol, reduziert.

Die Pikraminsäurereaktion wird durch Beimengungen von Fett und anderen Verunreinigungen stark beeinträchtigt.

3. Färbeversuch. Man bringt in die auf Pikrinsäure zu prüfende wässerige oder alkoholische Lösung je einen Faden weißer Wolle oder Seide und Baumwolle, läßt die Fäden 6—12 Stunden und länger darin liegen, nimmt sie dann heraus und spült sie mit Wasser gut aus. Bei Vorhandensein von Pikrinsäure ist nur der Woll- oder Seidenfaden, nicht aber der Baumwollfaden gelb gefärbt. Pikrinsäure färbt nur tierische Faser, nicht aber pflanzliche, also auch nicht Baumwolle.

Bei einer Verdünnung der Pikrinsäurelösung von 1:100000 färbt sich Wolle noch deutlich gelb.

4. Versetzt man eine wässerige Pikrinsäurelösung mit einigen Tropfen einer mit überschüssigem Ammoniak versetzten Kupfersulfatlösung, so entsteht ein gelbgrüner, aus nadelförmigen, hexagonalen Kriställchen bestehender Niederschlag, der das Licht stark polarisiert.

1 *mg* Pikrinsäure, welches in 8 cm^3 Wasser gelöst ist, gibt noch einen solchen, aus Kriställchen bestehenden Niederschlag.

Acetanilid.

Acetanilid oder Antifebrin, $C_6H_5 . NH . CO . CH_3$, kristallisiert aus Wasser in farblosen, glänzenden, bei 113—114° schmelzenden Blättchen, die geruchlos und von schwach brennendem Geschmacke sind. Es löst sich in 230 Teilen kaltem, in etwa 22 Teilen siedendem Wasser sowie in 3·5 Teilen Alkohol. In Äther und noch mehr in Chloroform ist es leicht löslich. Alle Lösungen des Acetanilids reagieren neutral.

Beim Kochen mit Kalilauge, Natronlauge oder rauchender Salzsäure wird Acetanilid in seine Komponenten Anilin und Essigsäure hydrolytisch gespalten.

Acetanilid besitzt als Abkömmling des Anilins giftige Eigenschaften, die freilich im Vergleich zur Muttersubstanz erheblich abgeschwächt sind. *R. Kobert* berichtet in seinen „Intoxikationen" über verschiedene, freilich nicht tödlich verlaufende Vergiftungen mit Acetanilid. Bei einem Studenten, der das Mittel kaffeelöffelvollweise genommen hatte, kam es zu Benommenheit, Angst, stärkster Cyanose und Kleinwerden des Pulses. Trotz Abführmittel und Analeptika (erregende Mittel) blieb für mehrere Tage große

Mattigkeit zurück. Bei einem Manne, welcher 2 Tage hintereinander je 2·0 *g* Antifebrin genommen hatte, kam fast das gleiche Vergiftungsbild zustande.

Reaktionen des Acetanilids.

Acetanilid läßt sich aus wässeriger, weinsaurer Lösung mit Äther oder Chloroform vollständig ausschütteln.

1. Indophenolprobe. Wird Acetanilid in einem Probierröhrchen mit etwa 4 cm^3 rauchender Salzsäure tüchtig gekocht und die Lösung auf etwa 10 Tropfen eingedampft, dann nach dem Erkalten mit 2—4 cm^3 gesättigtem Karbolwasser versetzt, so ruft Chlorkalklösung, tropfenweise zugesetzt, eine schmutzige rotviolette Färbung hervor, die beim Umschütteln meist an Intensität zunimmt. Schichtet man vorsichtig Ammoniakflüssigkeit darüber, so färbt sich die obere Schicht schön und beständig indigoblau. Die indigoblaue Färbung ist nur in Verbindung mit der zuerst auftretenden rotvioletten Färbung für Acetanilid charakteristisch, da sich ja das Gemisch von wässeriger Phenollösung und einer Hypochloritlösung, schon für sich allein, mit Ammoniak blau färbt.

Phenacetin gibt ebenfalls die Indophenolprobe.

2. Isonitrilprobe. Wird Acetanilid mit etwa 5 cm^3 alkoholischer Kalilauge einige Minuten lang gekocht, nach dem Abkühlen mit 2 bis 3 Tröpfchen Chloroform versetzt und nochmals zum Sieden erhitzt, so macht sich der widerliche Geruch des Phenylisonitrils bemerkbar. Kalilauge spaltet hierbei das Acetanilid in essigsaures Kalium und Anilin, welches mit dem Chloroform Phenylisonitril bildet.

3. Abspaltung von Anilin und Nachweis desselben. Man kocht das Acetanilid einige Minuten tüchtig mit alkoholischer Kalilauge, verdünnt mit Wasser, schüttelt das Anilin mit wenig Äther aus, läßt die Ätherlösung eindunsten und weist das Anilin in der wässerigen Lösung des öligen Rückstandes nach, und zwar mit Chlorkalklösung und mittelst der Isonitrilprobe.

Untersuchung des Acetanilidharns.

Unverändert gebliebenes Acetanilid findet sich selbst nach großen Dosen höchstens in Spuren im Harn vor. Es wird zum allergrößten Teil im menschlichen Organismus im Benzolkern oxydiert und dadurch in acetiliertes p-Aminophenol umgewandelt, das sich, wie fast alle Phenole, mit Schwefelsäure zu einer Ätherschwefelsäure, der Acetyl-p-Aminophenolschwefelsäure, $CH_3.CO.NH.C_6H_4.O.SO_2.OH$, paart, die als Alkalisalz mit dem Harne ausgeschieden wird.

Zum Teil wird auch eine gepaarte Glukuronsäure des Acetyl-p-Aminophenols gebildet. Diese gepaarten Verbindungen geben beim Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure p-Aminophenol, das sich mit Hilfe der oben angeführten Indophenolprobe nachweisen läßt.

Kocht man einen „Acetanilidharn" (500 cm^3 und mehr) einige Minuten mit konzentrierter Salzsäure, übersättigt hierauf mit Natriumkarbonat und

schüttelt nach dem Erkalten mit größeren Mengen Äther wiederholt aus, so hinterläßt der Ätherauszug beim Abdestillieren oder Verdunsten das p-Aminophenol meistens als ein rötlich bis bräunlich gefärbtes Öl, dessen wässerige Lösung die Indophenolprobe sehr schön gibt.

Phenacetin.

Phenacetin, p-Acetphenetidin, $C_2H_5O.C_6H_4.NH.CO.CH_3$ (1:4), bildet farblose, glänzende, geruch- und geschmacklose, bei 134—135° schmelzende Kristallblättchen. Es löst sich in etwa 1400 Teilen kaltem Wasser, in etwa 70 Teilen siedendem Wasser, sowie in 16 Teilen Alkohol. Von Äther und Chloroform wird es reichlich gelöst. Seine Lösungen reagieren neutral. Von Schwefelsäure wird es ohne Färbung gelöst. Im Unterschied zum nahe verwandten Acetanilid gibt Phenacetin die Isonitrilprobe nicht.

Reaktionen des Phenacetins.

Phenacetin geht aus wässeriger, weinsaurer Lösung vollständig in Äther und in Chloroform über.

1. Kocht man Phenacetin einige Minuten mit etwa 3 *cm*³ konzentrierter Salzsäure, verdünnt dann mit 10 *cm*³ Wasser und filtriert nach dem Erkalten ab, so nimmt das Filtrat auf Zusatz einiger Tropfen Chromsäurelösung allmählich eine rubinrote Färbung an. — Statt der Chromsäure kann als Oxydationsmittel auch starkes Chlorwasser verwendet werden.

2. Indophenolprobe. Phenacetin in gleicher Weise wie Acetanilid behandelt, gibt sehr schön die Indophenolprobe. Statt der Chlorkalklösung kann für die Herstellung des Indophenols als Oxydationsmittel auch starkes Chlorwasser oder eine 3%ige Chromsäurelösung Verwendung finden.

3. Die Salpetersäureproben von *W. Autenrieth* und *O. Hinsberg.*[1])

a) Mit verdünnter Salpetersäure. Erhitzt man Phenacetin mit einigen Kubikzentimetern verdünnter Salpetersäure (mit 10—12% HNO_3) zum Sieden, so geht es mit intensiv gelber oder orangeroter Farbe in Lösung; falls diese Lösung hinreichend konzentriert ist, kristallisiert das entstandene Mononitrophenacetin, $C_6H_3(NO_2)(OC_2H_5)(NHCOCH_3)$, beim Erkalten in langen, gelben, bei 103° schmelzenden Nadeln aus. — Diese Probe ist empfindlich und auch charakteristisch für Phenacetin, wenn es gelingt, das Nitrophenacetin in Kristallen zu erhalten, von welchem dann der Schmelzpunkt bestimmt werden kann. Die Probe kann auch zur Unterscheidung des Phenacetins vom Acetanilid und Antipyrin verwendet werden, welche beim Erwärmen mit verdünnter Salpetersäure farblose Lösungen geben.

[1]) *W. Autenrieth* und *O. Hinsberg*, Zur Kenntnis des Phenacetins und über m-Äthoxy-o-phenylendiamin. Archiv d. Pharm. 229, 456 (1891).

b) Mit konzentrierter Salpetersäure. Wird Phenacetin mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure übergossen, so färbt es sich gelb bis orangerot und geht mit gleicher Farbe allmählich in Lösung; beim Erwärmen löst sich das Phenacetin vollständig auf und beim Erkalten kristallisiert unter Umständen Nitrophenacetin aus.

Salicylsäure.

Salicylsäure, o-Oxybenzoesäure, $HO.C_6H_4.COOH$ (1·2), kristallisiert aus Wasser in langen, weißen, bei 157° schmelzenden Nädelchen von süßlich-saurem, kratzendem Geschmacke; die Säure ist löslich in etwa 500 Teilen kaltem Wasser, in 15 Teilen siedendem Wasser, sowie leicht löslich in Alkohol, Äther und in heißem Chloroform. Bei vorsichtigem Erhitzen sublimiert Salicylsäure unzersetzt in feinen Nädelchen, in Spuren schon auf dem Wasserbade; bei raschem Erhitzen zerfällt sie aber teilweise in Phenol und Kohlendioxyd: $C_6H_4(OH)COOH = C_6H_5OH + CO_2$.

Konzentrierte Schwefelsäure löst die reine Salicylsäure ohne Färbung und ohne Zersetzung auf. Von den Salzen der Salicylsäure sind das Blei- und das Silbersalz in Wasser schwer löslich. Bleiacetat fällt daher aus den neutralen Salicylatlösungen weißes, kristallinisches, in heißem Wasser lösliches Bleisalicylat, $(HO.C_6H_4.COO)_2Pb$, das beim Erkalten der heißen Lösung unverändert auskristallisiert. Silbernitrat fällt weißes Silbersalicylat aus.

Reaktionen der Salicylsäure.

1. Eisenchloridprobe. Eine wässerige Lösung der Salicylsäure und ihrer Salze färbt sich mit einigen Tropfen Eisenchloridlösung blauviolett, in stärkerer Verdünnung mehr rotviolett. Auf Zusatz von Salzsäure geht das Violett in Gelb über. Ein Überschuß des Reagenses beeinträchtigt die Empfindlichkeit der Probe.

Bei Anwesenheit von Mineralsäuren, Alkalilaugen oder Alkalikarbonat bleibt die Reaktion aus.

2. *Millon*sche Probe. Eine wässerige Salicylsäurelösung färbt sich beim Erwärmen mit *Millons* Reagens tief rot.

3. Bromwasserprobe. Überschüssiges Bromwasser fällt aus einer selbst stark verdünnten, wässerigen Salicylsäurelösung einen gelblichweißen, kristallinischen Niederschlag von Tribromphenolbrom, $C_6H_2Br_3.OBr$.

4. Darstellung der reinen Säure und Bestimmung des Schmelzpunktes. Liegt nicht zu wenig Salicylsäure vor, so löst man den aus der Ätherlösung erhaltenen Verdunstungsrückstand in möglichst wenig heißem Wasser auf, schüttelt die heiße Lösung mit wenig Blutkohle und läßt sie nach dem Filtrieren kristallisieren. Von den ausgeschiedenen Kristallnadeln bestimmt man nach dem Trocknen den Schmelzpunkt (157°).

Die Trennung der Salicylsäure von einfachen Phenolen.

Die unter 1 bis 3 angeführten Reaktionen beweisen nur dann das Vorhandensein von Salicylsäure, wenn einfache Phenole wie Karbolsäure und die Kresole nicht zugegen sind. Eine Trennung der Salicylsäure von den Phenolen kann aber erzielt werden, wenn man die in Frage kommende Substanz (Lösung, Gemisch etc.) mit kalter Natriumkarbonatlösung im Überschusse versetzt und die hierbei unverändert gebliebenen Phenole mit Äther ausschüttelt. Die Salicylsäure findet sich dann als Natriumsalz in der wässerigen Lösung vor und kann nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure mit Äther ausgeschüttelt werden.

Quantitative Bestimmung der Salicylsäure als Tribromphenolbrom nach *W. Autenrieth* und *Beuttel*.[1])

Man fällt die wässerige Lösung der Salicylsäure in einer Glasstöpselflasche mit gesättigtem Bromwasser im Überschusse unter Umschütteln vollständig aus, so daß die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit rotbraun gefärbt ist und läßt, unter häufigem Umschütteln, 12—24 Stunden lang kalt, am besten in einem Eisschranke, stehen. Den Niederschlag von Tribromphenolbrom sammelt man alsdann im gewogenen Goochtiegel und trocknet ihn im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure bis zum konstanten Gewicht. Die dem erhaltenen Niederschlage entsprechende Menge Salicylsäure erfährt man unter Zugrundelegung der folgenden Proportion:

$$C_6H_2Br_4O : C_7H_6O_3 = \text{gefundene Menge Niederschlag} : x$$
$$(409{\cdot}86) \quad (138{\cdot}05).$$

Nachweis der Salicylsäure im Harn.

Salicylsäure geht im menschlichen Körper durch Paarung mit Glykokoll zum Teil in Salicylursäure über, die nebst größeren Mengen unverändert gebliebener Salicylsäure mit dem Harn ausgeschieden wird:

$$HO.C_6H_4.CO\,\vdots\,OH + H\,\vdots\,NH.CH_2.COOH = H_2O + HO.C_6H_4.CO.NH.CH_2.COOH$$

Salicylsäure Glykokoll = Wasser + Salicylursäure.

Ein solcher „Salicylharn" färbt sich mit Eisenchloridlösung violettblau. Salicylursäure gibt wie die Salicylsäure die Eisenchloridprobe. Zur Spaltung in ihre Komponenten muß die Salicylursäure etwa $^1/_2$ Stunde mit rauchender Salzsäure unter Rückfluß erhitzt werden.

Will man die unverändert gebliebene Salicylsäure aus einem Harn abscheiden, so schüttelt man eine größere Menge Harn (500—1000 cm^3) nach dem Ansäuern mit Salzsäure wiederholt mit Äther aus, trennt die Ätherschicht in einem Scheidetrichter und schüttelt sie alsdann mit überschüssiger Natriumkarbonatlösung tüchtig durch, wodurch die Salicylsäure in die wässerige Flüssigkeit übergeht. Aus dieser wird nun durch Ansäuern mit Salzsäure die Salicylsäure wieder frei gemacht und mit Äther ausgeschüttelt, der dann beim Verdunsten die Säure, meist schon kristallisiert zurückläßt. Zu ihrer weiteren Reinigung kann sie unter Zugabe von Tierkohle aus wenig heißem Wasser umkristallisiert werden. Salicylsäure wird von allen Schleimhäuten rasch aufgenommen und rasch resorbiert. Für gewöhnlich beginnt die Ausscheidung der Salicylsäure durch den Harn in der ersten halben Stunde und ist nach drei Tagen beendet.

---

[1]) *W. Autenrieth* und *Fr. Beuttel*, Über die Bestimmung des Phenols, Salicylalkohols und der Salicylsäure als Tribromphenolbrom. Archiv d. Pharm. 248. 112 (1910).

Veronal.

Veronal, C-Diäthylbarbitursäure, C-Diäthylmalonylharnstoff, $C_8H_{12}O_3N_2$, wird aus heißem Wasser in großen, farblosen, spießartigen, bei 191° (korrigiert) schmelzenden Kristallen erhalten, die bei 20° in 146—147 Teilen, bei 100° in 15 Teilen Wasser löslich sind; von heißem Alkohol und von Aceton wird Veronal reichlich gelöst, während es in kaltem Äther ziemlich schwer löslich ist. Die wässerige Lösung des Veronals schmeckt bitter und reagiert auf empfindliches blaues Lackmuspapier ganz schwach sauer. — Veronal löst sich leicht in Alkalilaugen, Ammoniak, Kalk- und Barytwasser und fällt beim Ansäuern derartiger Lösungen, falls sie hinreichend konzentriert sind, unverändert wieder aus, und zwar meist kristallinisch. Von den Salzen des Veronals kristallisiert das Natriumsalz, $C_8H_{11}O_3N_2Na$, am besten; man erhält es durch Auflösen des Veronals in der berechneten Menge karbonatfreier Natronlauge und Verdunstenlassen dieser Lösung unter Ausschluß von Kohlensäure, oder durch Zusatz von Alkohol bis zur Trübung. In beiden Fällen scheidet sich das Natriumsalz des Veronals in prächtigen, glänzenden Kristallen aus.

Veronal wirkt auf das Blut nicht zersetzend ein und scheint bei den üblichen medizinalen Dosen (0·5—1 *g*) auch eine weitgehendere Wirkung auf das Herz nicht auszuüben. Kumulative Wirkung ist nur vereinzelt beobachtet worden. In größeren Dosen kann aber Veronal unter Umständen schwere Vergiftungen mit tödlichem Ausgange hervorrufen.

Nachweis des Veronals bei toxikologischen Untersuchungen.

Aus verschiedenen Leichenteilen, nämlich aus Leber, Milz und Niere eines Mannes, der infolge Verwechslung zweier Arzneimittel an Stelle eines Bandwurmmittels (Kamala) Veronal erhalten hatte, haben *G.* und *H. Frerichs*[1]) kleinere Mengen von Veronal abscheiden können, und zwar wurde es nach dem Verfahren von Stas-Otto der wässerigen, weinsauren Lösung mit Äther entzogen. Der aus dem Ätherauszuge beim Eindunsten gebliebene Rückstand lieferte beim Umkristallisieren aus wenig heißem Wasser, unter Zugabe von Blutkohle, Kristalle, die in der folgenden Weise als Veronalkristalle erkannt wurden:

1. Die wässerige Lösung der Kristalle reagierte schwach sauer.

2. Die Kristalle lösten sich in Kalilauge, Natronlauge sowie in wässerigem Ammoniak und wurden beim Ansäuern dieser alkalischen Lösungen mit verdünnter Salzsäure wieder unverändert ausgefällt.

3. Der Schmelzpunkt der Kristalle wurde zu 187—188° gefunden. Auch ein Gemisch aus den fraglichen Kristallen und reinem Veronal zeigte den gleichen Schmelzpunkt.

4. Nachweis des Stickstoffs durch Zusammenschmelzen im trockenen Reagensglas mit metallischem Natrium und Prüfung der in Wasser ge-

[1]) *G.* und *H. Frerichs,* Über den Nachweis einer Veronalvergiftung. Archiv d. Pharm. Bd. 244. 86—90 (1906).

lösten, erkalteten Schmelze mit Hilfe der Berlinerblaureaktion auf einen Gehalt von Cyannatrium.

5. Sublimation im trockenen Reagenzglas beim Erhitzen. Vergleiche mit notorisch reinem Veronal.

Nachweis des Veronals im Harn.

Nach Untersuchung von *E. Fischer* und *J. v. Mering*[1]) sowie von *B. Molle* und *H. Kleist*[2]) verläßt Veronal den menschlichen Körper zum allergrößten Teil unverändert, so daß es sich dann zu 70—90% im Harn vorfindet. Bei toxikologischen Untersuchungen wird man daher das Veronal in erster Linie im Harn nachzuweisen haben. Zu dem Zweck wird eine größere Menge des in Frage kommenden Harns auf dem Wasserbade[3]) auf ein kleineres Volumen, etwa auf 1/5 des ursprünglichen, konzentriert, dann wird wiederholt mit relativ viel Äther ausgeschüttelt, da Veronal in diesem Lösungsmittel ziemlich schwer löslich ist. Der beim Abdestillieren des Äthers bleibende, meist stark dunkel gefärbte Rückstand wird in möglichst wenig heißem Wasser gelöst, die Lösung mit Blutkohle 1/4 Stunde lang gekocht, dann wird abfiltriert. Beim Abkühlen des nahezu farblos gewordenen Filtrats mit Eis kristallisiert das Veronal in farblosen Nadeln (Schmp. 191°, korrigiert) aus.

Nach Eingabe von 4 *g* Veronal innerhalb 2 Tagen hatten *E. Fischer* und *v. Mering* aus dem fünftägigen Harne 2·49 *g* Veronal = 62% des angewandten Veronals wiedergewonnen. Dazu ist zu bemerken, daß die angegebene Methode nicht absolut quantitativ ist und auch die Ausscheidung des Veronals nach 5 Tagen noch nicht völlig beendet war. Die erhaltenen Kristalle sucht man in der oben angegebenen Weise als Veronalkristalle näher zu charakterisieren.

Molle und *Kleist* fällen den Harn erst mit Bleiacetat vollständig aus, entfernen aus dem Filtrat das gelöste Blei mit Schwefelwasserstoff, kochen den letzteren weg, verdünnen den so vorbehandelten Harn mit Wasser auf das doppelte Volumen und kochen ihn mit Blutkohle. Das Filtrat wird dann auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingedunstet, nach dem Erkalten mit Kochsalz gesättigt und dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die filtrierte Ätherlösung hinterläßt beim Abdestillieren nahezu reines Veronal.

Antipyrin.

Antipyrin, 1-Phenyl-2, 3-dimethyl-isopyrazolon, $C_{11}H_{12}ON_2$, bildet nadelförmige, schwach bitter schmeckende, bei 113° schmelzende, monokline Kristalle. 1 Teil Antipyrin wird von weniger als von 1 Teil kaltem Wasser, von etwa 1 Teil Alkohol, von 1 Teil Chloroform

[1]) Die Therapie der Gegenwart. 45. 1904.

[2]) *B. Molle* und *H. Kleist*, Über Veronal. Archiv d. Pharm. Bd. **242**. 401 (1904).

[3]) *E. Fischer* und *v. Mering* lassen den Harn unter vermindertem Druck eindampfen.

und von etwa 50 Teilen Äther gelöst. Die wässerigen Antipyrinlösungen reagieren neutral, obgleich Antipyrin als Base mit Säuren kristallisierende Salze bildet.

Nachweis des Antipyrins.

Selbst aus stark weinsaurer Lösung lassen sich geringe Mengen von Antipyrin mit Äther ausschütteln; bei weitem der größte Teil des Antipyrins geht erst aus der wässerig-alkalischen Flüssigkeit in Äther, besser in Chloroform über. — Antipyrin unterscheidet sich von den meisten Alkaloiden durch seine große Löslichkeit in Wasser. — Zum Nachweis des Antipyrins löst man den Verdunstungsrückstand der Ätherlösung in wenig Wasser auf und führt mit der abfiltrierten Lösung die folgenden Proben auf Antipyrin aus:

1. Eisenchloridprobe. 1 bis 2 Tropfen Eisenchloridlösung färben die Lösung tiefrot, wenn sie antipyrinhaltig ist. Die Färbung ist bei einer Verdünnung der Antipyrinlösung von 1:100000 noch deutlich wahrzunehmen.

2. Gerbsäureprobe. Gerbsäurelösung fällt bei einem Antipyringehalt der Lösung einen weißen Niederschlag aus.

3. Probe mit rauchender Salpetersäure. Fügt man zu der betreffenden Lösung 1 bis 2 Tropfen rauchende Salpetersäure, so färbt sie sich bei Vorhandensein von Antipyrin grün; erhitzt man alsdann zum Sieden und fügt einen weiteren Tropfen rauchende Salpetersäure hinzu, so geht die grüne Farbe in Rot über. — 1 cm^3 einer wässerigen Antipyrinlösung von 1:200 gibt diese Probe noch deutlich.

4. Nitrosoantipyrin. Versetzt man die Lösung mit einigen Tropfen Kaliumnitrit- oder Natriumnitritlösung und mit verdünnter Schwefelsäure, so färbt sie sich, falls sie antipyrinhaltig ist, grün oder blaugrün. — Statt der Schwefelsäure kann auch Essigsäure genommen werden, doch ist dann ein Erhitzen der Lösung erforderlich. Ist die Antipyrinlösung hinreichend konzentriert, so scheiden sich nach einiger Zeit grüne Kristalle von Nitrosoantipyrin, $C_{11}H_{11}(NO)ON_2$, ab.

Nachweis des Antipyrins im Harn.

Antipyrin geht zum Teil unverändert, zum Teil als Oxyantipyringlukuronsäure in den Harn über und kann darin meist mit Eisenchloridlösung direkt nachgewiesen werden. Ist der Harn stark gefärbt, so schüttelt man eine größere Menge desselben, nach Zusatz von Ammoniak oder Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion, mit Chloroform aus und prüft den in Wasser gelösten Verdunstungsrückstand der Chloroformlösung mit Eisenchlorid oder mit rauchender Salpetersäure auf Antipyringehalt.

Koffein.

Koffein, Kaffein, Thein, 1, 3, 7-Trimethyl- 2, 6-Dioxypurin, $C_8H_{10}O_2N_4 . H_2O$, kristallisiert in weißen, glänzenden Nädelchen,

welche mit 80 Teilen Wasser eine farblose, neutral reagierende, schwach bitter schmeckende Lösung geben. Es ist in zwei Teilen heißem Wasser, in etwa 50 Teilen Weingeist und in 9 Teilen Chloroform löslich, wird aber von Äther nur wenig, vom absolutem Alkohol wie auch von Benzol und Petroläther sehr wenig gelöst. Aus heißem Wasser kristallisiert Koffein mit 1 Mol. Kristallwasser, das teilweise schon beim Liegen an der Luft und vollständig bei 100°, entweicht. Es schmilzt bei 230°, beginnt jedoch wenig über 100° sich in geringer Menge zu verflüchten und bereits bei 180° ohne Rückstand in farblosen Nadeln zu sublimieren. Konzentrierte Schwefelsäure sowie konzentrierte Salpetersäure lösen Koffein ohne Färbung auf. Koffein ist eine sehr schwache Base, deren Salze durch Wasser zersetzt werden. Aus diesem Grunde läßt sich Koffein aus wässeriger, weinsaurer Lösung mit Äther, besser mit Chloroform wenigstens zum Teil ausschütteln.

Schicksal des Koffeins im menschlichen Stoffwechsel.

Nur ein kleiner Teil des Koffeins geht unverändert durch den Organismus hindurch und erscheint alsdann im Harn als solches. Ein anderer Teil, nämlich etwa 10% der eingenommenen Menge, findet sich in Form von Abbauprodukten im Harn vor. Alles übrige Koffein dürfte in die normalen Endprodukte des menschlichen Stoffwechsels umgewandelt werden. Der größte Teil des Stickstoffs des Koffeins gelangt als Harnstoff zur Ausscheidung. Höchst bemerkenswert ist die Tatsache, daß die ersten Abbauprodukte des Koffeins Di- und Monomethylxanthine sind, die also aus dem Koffein unter Abspaltung von Methylgruppen entstehen. Unter den letzteren ist es besonders das 7-Monomethylxanthin und unter den Dimethylxanthinen das Paraxanthin = 1, 7-Dimethylxanthin, welche im Harn nach Eingabe von Koffein auftreten. Paraxanthin ist mit Theophyllin oder 1, 3-Dimethylxanthin und mit Theobromin oder 3, 7-Dimethylxanthin isomer.

Nachweis des Koffeins.

Aus einer wässerigen, weinsauren Lösung gehen nur geringe Mengen Koffein in den Äther über; die größte Menge des Alkaloids findet sich im Ätherauszug der wässerig-alkalischen Flüssigkeit vor. Da Koffein in Äther ziemlich schwer, in Chloroform erheblich leichter löslich ist, ist es meist auch im Chloroformauszuge der mit Ammoniak alkalisch gemachten Lösung enthalten. Beim Eindunsten der beiden letzteren Auszüge bleibt Koffein in langen, glänzenden, konzentrisch gruppierten Nadeln zurück. Beim Arbeiten nach dem Verfahren *Stas-Otto* wird somit vorhandenes Koffein in allen drei Auszügen vorgefunden.

1. Wird Koffein in einem Schälchen mit einigen Kubikzentimetern gesättigtem Chlorwasser[1]) auf dem Wasserbade zur Trockne ver-

[1]) Gesättigtes Chlorwasser wird jederzeit leicht in der Weise erhalten, daß man in einem engeren Reagenzglase einige Kristalle chlorsaures Kalium mit mäßig

dampft, so hinterbleibt ein rotbrauner Rückstand, der sich bei sofortiger Einwirkung von sehr wenig Ammoniak schön purpurviolett färbt. Zu dem Zwecke bedeckt man das Schälchen mit dem Verdampfungsrückstande mit einer Glasplatte, die mit einem Tropfen starker Ammoniakflüssigkeit befeuchtet ist. Oder man führt den Versuch auf zwei abgepaßten Uhrschälchen aus: auf dem einen Schälchen verdampft man die auf Koffein zu prüfende Substanz mit Chlorwasser zur Trockne und legt dann dieses Schälchen mit dem Verdampfungsrückstand für kurze Zeit auf das anderes Uhrglas, das einen Tropfen starke Ammoniak enthält.

Auch Xanthin, Theobromin, das 1- und 7-Monomethylxanthin und das Paraxanthin geben diese Probe, die Murexidreaktion, besonders wenn man in der folgenden von *E. Fischer*[1]) angegebenen Weise arbeitet. Man kocht die zu prüfende Substanz in einem Reagenzgläschen mit starkem Chlorwasser oder mit Salzsäure und wenig Kaliumchlorat, dampft dann die Flüssigkeit im Schälchen vorsichtig ein und befeuchtet den Rückstand mit Ammoniaklösung.

2. Gerbsäurelösung ruft in wässerigen Koffeinlösungen starke, weiße Fällungen hervor, die sich im Überschusse des Fällungsmittels wieder leicht lösen. — Diese Probe ist selbstverständlich für Koffein nicht charakteristisch.

B. Die Untersuchung des Ätherauszuges der wässerig-alkalischen Flüssigkeit.

Dieser Ätherauszug enthält die Mehrzahl der eigentlichen Alkaloide.

Die in einem Scheidetrichter vom Äther getrennte, wässerige, weinsaure Lösung wird erst mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt, um die Alkaloide aus ihren Salzen frei zu machen und etwa vorhandenes Morphin oder Apomorphin an das Alkali zu binden, dann in einem Scheidetrichter mit etwa der gleichen Menge Äther tüchtig ausgeschüttelt, der nun die freien Alkaloide, mit Ausnahme von Apomorphin, Morphin und Narcein, aufnimmt. Die Ätherschicht wird alsdann von der wässerigen Flüssigkeit getrennt, die letztere mit einer neuen Menge Äther gründlich ausgeschüttelt und der Ätherauszug wiederum abgetrennt. Auf diese Weise stellt man drei bis vier solcher Ätherauszüge her, die gemischt und in einem nur lose verschlossenen, trockenen Erlenmeyerkolben für 1—2 Stunden zum Absitzenlassen beiseite gestellt werden. Hierbei scheiden sich fast immer noch einige Tropfen wässeriger Flüssigkeit ab, von welcher die Ätherlösung durch ein trockenes Filter vorsichtig abgegossen und das aufgesammelte Filtrat auf einer nicht zu großen Uhrschale, von 8 bis 10 *cm* Durchmesser, bei gelinder Wärme

verdünnter Salzsäure erhitzt und das sich entwickelnde Chlor in wenig Wasser einleitet, das sich in einem weiteren Reagenzglase befindet.

[1]) *Emil Fischer*, Synthese des Hypoxanthins, Xanthins, Adenins und Guanins. Berichte der Deutsch. chem. Ges. **30**. 2236 (1897).

auf dem warmen Wasserbade eingedunstet wird. Die letzten Tropfen der Ätherlösung läßt man freiwillig verdunsten. Bleiben hierbei stark riechende Öltröpfchen zurück, so müssen dieselben auf Coniin und Nikotin, eventuell auch auf Anilin untersucht werden. Liegt keines dieser flüchtigen Alkaloide vor, so verflüchtigt man das durch die Verdunstung des Äthers entstandene Wasser durch gelindes Erwärmen der Schale auf dem Wasserbade vollständig und nimmt dann die Uhrschale sofort vom Wasserbade weg. Ein längeres Erhitzen der Schale empfiehlt sich nicht, weil sonst die Ätherrückstände verschmieren können. Der Verdunstungsrückstand des aus der wässerig-alkalischen Flüssigkeit gewonnenen Ätherauszuges kann alle Alkaloide, ausgenommen Apomorphin, Morphin und Narcein, enthalten und ist besonders auf die folgenden Stoffe zu untersuchen:

Coniin	Physostigmin
Nikotin	Kodein
Anilin	Narkotin
Veratrin	Hydrastin
Strychnin	Pilocarpin
Brucin	Chinin
Atropin	Koffein
Scopolamin	Antipyrin
Kokain	Pyramidon.

Von dem Verdunstungsrückstande des Ätherauszuges bestimmt man durch mikroskopische Untersuchung das Aussehen, ferner den Geschmack, weil man hieraus in vielen Fällen einen gewissen Aufschluß darüber gewinnt, welches oder welche Alkaloide voraussichtlich vorhanden sein können; auf diese Stoffe wird dann in erster Linie geprüft.

Beim Eindunsten der ätherischen Lösung hinterbleibt Strychnin in sehr feinen, sehr stark bitter schmeckenden Kristallnadeln, Brucin als weißes, amorphes, stark bitter schmeckendes Pulver, Veratrin amorph, pulverig, von brennend scharfem Geschmacke, während Atropin und Chinin als harzige, klebrige, selten kristallisiert werdende Firnisse zurückbleiben. Koffein hinterbleibt in langen, häufig konzentrisch gruppierten, schwach bitter schmeckenden Nadeln und ebenso bildet Pyramidon feine, in Wasser leicht lösliche, schwach bitter schmeckende Kristallnädelchen.

Hinterläßt der Ätherauszug beim Eindunsten nur einen geringen Rückstand, der zudem nicht bitter schmeckt, so liegt häufig kein eigentliches Alkaloid vor; ein solcher Rückstand kann aus Fett, harziger Substanz oder auch aus Spuren stickstoffhaltiger Stoffe (wie aus Peptonen also peptidartigen Substanzen oder anderen Spaltungsprodukten der Proteine) bestehen. Bei der Untersuchung von Leichenteilen nach dem *Stas-Otto*schen Verfahren auf Alkaloide und andere hierher gehöriger Stoffe erhält man selbst bei sehr sorgfältigem Arbeiten fast immer Ätherauszüge, die einen geringen Verdunstungsrückstand liefern, auch wenn

Alkaloide oder Ptomaine nicht vorhanden sind. Will man sich davon überzeugen, daß kein Alkaloid vorliegt, so löst man einen Teil des Ätherrückstandes in Wasser unter Zusatz eines Tröpfchens verdünnter Salzsäure, verteilt diese, nötigenfalls filtrierte Lösung auf mehrere Probierröhrchen und untersucht sie mit verschiedenen der allgemeinen Alkaloidreagenzien, wie mit Quecksilberchlorid, Jod-Jodkalium, Quecksilberjodid-jodkalium, Pikrinsäure und Gerbsäurelösung etc., auf einen etwaigen Alkaloidgehalt. Entstehen hierbei keine charakteristischen Niederschläge, so ist auch kein Alkaloid vorhanden. Es empfiehlt sich übrigens, immer diese Vorprüfung auf Alkaloide auszuführen, wozu man ja nur einen kleinen Teil des Verdunstungsrückstandes des Ätherauszuges nötig hat, da ja die allgemeinen Alkaloidreagenzien selbst noch Spuren von Alkaloiden anzeigen.

Um bei gerichtlich-chemischen Untersuchungen einen Irrtum oder ein Übersehen von einem Giftstoff möglichst auszuschließen, löst Verfasser den Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges, falls er sehr gering ist, in wenig stark verdünnter Salzsäure (von etwa 0·5% HCl) auf, dunstet diese Lösung auf dem Wasserbade ein, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf und spritzt diese Lösung mit Hilfe einer *Pravaz*schen Spritze in den Lymphsack eines kleineren munteren Frosches ein. Treten bei dem Frosche im Laufe mehrerer Stunden keinerlei Vergiftungserscheinungen auf, so kann man bestimmt angeben, daß der Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges eines von den stärker giftig wirkenden Alkaloiden nicht enthalten hat. — Oder man verreibt den Verdunstungsrückstand der Ätherlösung mit Zucker und gibt dieses Gemisch einer weißen Maus zu fressen.

Für die speziellen Alkaloidreaktionen verteilt man den erhaltenen Ätherrückstand mit Hilfe eines scharfen Platin- oder Nickelspatels oder eines feinen sauberen Taschenmessers auf mehrere Uhrschälchen, oder man löst den erhaltenen Rückstand nochmals in wenig heißem Alkohol auf, verteilt diese, nötigenfalls filtrierte Lösung auf verschiedene Uhrschälchen und läßt sie bei gelinder Wärme darauf eindunsten. *R. Mauch*[1]) löst den erhaltenen Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges in 75%iger Chloralhydratlösung auf und führt mit der so erhaltenen Lösung die Reaktionen der Alkaloide aus.

Die Reinigung des Alkaloidrückstandes.

Sind die Alkaloide mit schmierigen, harzigen oder fettigen Stoffen stark verunreinigt, so können manche Reaktionen der Alkaloide entweder ganz ausbleiben oder nur undeutlich eintreten. In einem solchen Falle muß der erhaltene Alkaloidrückstand nach einem der beiden folgenden Verfahren von den beigemengten Verunreinigungen möglichst befreit werden.

[1]) *Richard Mauch* (Mitteilungen aus dem Institut des Prof. Dr. *E. Schaer* in Straßburg). Festgabe des Deutschen Apothekervereins, Straßburg 1907.

1. Man durchrührt den Ätherrückstand kalt mit salzsäurehaltigem Wasser, filtriert ungelöst bleibende Stoffe (Fett und harzige Stoffe) ab, versetzt das Filtrat mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion und schüttelt mit Äther gut aus. Dieser Ätherauszug hinterläßt beim Eindunsten die Alkaloide meist in ziemlich reinem Zustande.

2. Oder man löst den Ätherrückstand in heißem Amylalkohol auf, schüttelt diese Lösung mit einigen Kubikzentimetern stark verdünnter Schwefelsäure aus und trennt die beiden Flüssigkeitsschichten in einem Scheidetrichter. Der Amylalkohol hält hierbei die schmierigen und färbenden Verunreinigungen zurück, während die Alkaloide als schwefelsaure Salze in die wässerige Flüssigkeit übergehen. Die letztere wird nun abgetrennt, mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Dieser Ätherauszug hinterläßt beim Eindunsten meist reines Alkaloid. Das zuletzt angegebene Reinigungsverfahren empfiehlt sich besonders bei einem stark gefärbten Alkaloidrückstande.

Coniin.

Coniin, a-Normal-Propylpiperidin, $C_8 H_{16} NH$, findet sich neben n-Methylconiin, Conhydrin, γ-Conicein und Pseudoconhydrin in allen Teilen der Schierlingspflanze, Conium maculatum, und bildet eine farblose, ölige, sehr giftige Flüssigkeit, die an der Luft unter Gelb- oder Braunfärbung teilweise verharrt. Coniin ist in kaltem Wasser ziemlich schwer, jedoch noch leichter löslich als in heißem Wasser; mit Alkohol, Äther, Chloroform und Benzol läßt es sich in jedem Verhältnisse klar mischen. Sein Geruch ist unangenehm betäubend, erinnert an den Geruch von Mäuseharn und ist weit stärker als der des Nikotins. Das natürlich vorkommende Coniin ist rechtsdrehend, $[\alpha]_D = + 18{\cdot}3°$). Coniin ist eine ziemlich starke, einsäurige Base, die beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid in Acetylconiin, $C_8 H_{16} . N . CO . CH_3$ beim Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge in Benzoylconiin, $C_8 H_{16} . N . CO . C_6 H_5$, und mit salpetriger Säure in Nitrosoconiin $C_8 H_{16} . N . NO$ übergeführt wird. Durch diese Reaktionen gibt sich Coniin als eine sekundäre Base zu erkennen.

Reaktionen des Coniins.

Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien zeichnen sich durch größere Empfindlichkeit für Coniin aus: Jod-Jodkalium (1 : 8000), Phosphormolybdänsäure (1 : 5000), Quecksilberjodidjodkalium (1 : 8000) und Wismutjodidjodkalium (1 : 5000). Gold- und Platinchlorid fällen nur konzentriertere Coniinlösungen (konzentrierter als 1 : 100) aus, während sie in Nikotinlösungen selbst bei einer Verdünnung von 1 : 10.000 bzw. 1 : 5000 noch Niederschläge hervorbringen. Coniin gibt sich im Verdunstungsrückstande der Ätherlösungen schon durch seinen charakteristischen Geruch zu erkennen. Man führt dann die beiden folgenden Reaktionen aus:

1. Löst man in einem Reagenzglase ein Tröpfchen Coniin unter Umschütteln gerade in so viel *kaltem* Wasser auf, als zur Herstellung einer klaren Lösung erforderlich ist, und erhitzt dann diese Lösung gelinde, so trübt sie sich durch ausgeschiedenen Coniin *milchig weiß*, da dieses in kaltem Wasser löslicher ist als in heißem. Die in der Wärme trübe gewordene Coniinlösung wird beim Abkühlen wieder klar. Man prüfe ferner die auf Coniin zu prüfende wässerige Lösung mit rotem Lackmuspapier: Coniinlösungen reagieren stark alkalisch.

2. Dunstet man eine Spur Coniin oder einer wässerigen Coniinlösung mit ein oder zwei Tröpfchen Salzsäure in einem Uhrschälchen oder auf einem Objektträger ein, so bleibt salzsaures Coniin, $C_8 H_{16} NH . HCl$ zurück; wird dieses unmittelbar nach dem Eindunsten bei etwa 200facher Vergrößerung unter dem Mikroskope betrachtet, so werden farblose oder schwach gelb gefärbte, nadel- bis säulenförmige, häufig zu Drusen vereinigte, sternförmig gruppierte Kristalle sichtbar, die das Farbenspiel der das Licht doppelt brechenden Substanzen zeigen.

Nikotin.

Nikotin, $C_{10} H_{14} N_2$, bildet eine farblose, an der Luft bald gelb und braun werdende, mit der Zeit vollständig verharzende, hygroskopische Flüssigkeit, die mit Wasser in jedem Verhältnisse mischbar ist (Unterschied von Coniin) und die auch von Alkohol, Äther, Amylalkohol, Benzol und Petroläther leicht gelöst wird. Es schmeckt scharf brennend und besitzt einen starken, besonders beim Erwärmen hervortretenden Tabakgeruch. Im chemisch reinen Zustande soll Nikotin fast geruchlos sein und den Tabakgeruch erst bei längerer Berührung mit der Luft wieder annehmen. Das natürlich vorkommende Nikotin ist optisch aktiv, und zwar linksdrehend, $[\alpha]_D = -161{\cdot}55^{\circ}$, während die Nikotinsalze Rechtsdrehung zeigen.

Nikotin ist eine ziemlich starke, zweisäurige, bitertiäre Base, die mit einem und mit zwei Äquivalenten Säure zum Teil gut kristallisierende Salze bildet. Als bitertiäre Base verbindet sich Nikotin mit zwei Mol. Methyljodid zu einem *Dijodmethylat*, $C_{10} H_{14} N_2 . 2 CH_3 J$. Daß Nikotin ein in β-Stellung substituiertes Pyridin ist, geht aus seinem Verhalten bei der Oxydation mit Salpetersäure, Chromsäure oder Kaliumpermanganat hervor, wobei *β-Pyridinmonokarbonsäure*, die Nikotinsäure, entsteht.

Physiologische Wirkung. Nikotin ist eines der *heftigsten Gifte*, das an Stärke der Giftigkeit und Schnelligkeit der Wirkung kaum der Blausäure nachsteht. Es scheint, als ob Nikotin ein Gift für alle Tierklassen wäre. Die Resorption desselben erfolgt von der Zunge, vom Auge und vom Mastdarm aus schon in wenigen Sekunden, vom Magen aus etwas langsamer; auch von der äußeren Haut aus ist eine Resorption des Nikotins möglich. Die Ausscheidung erfolgt durch die Lunge und die Niere. Im konzentrierten Zustande besitzt Nikotin eine *örtlich reizende Wirkung*, wenn es auch nicht eigentlich ätzend wirkt und wenn

auch bei Darreichung tödlicher Mengen per os die Entzündung der Magenschleimhaut wegen der Schnelligkeit des Verlaufes der Vergiftung sich nicht immer vorfindet. Ferner kommt dem Nikotin eine zentrale, nach kurzer Reizung lähmende Wirkung auf Gehirn und Rückenmark und endlich eine resorptive Wirkung auf verschiedene Organe, wie Herz, Auge, Darmtraktus, zu. Sehr wahrscheinlich werden alle Teile des Gehirns, die Medulla oblongata und das Rückenmark von der Giftwirkung ergriffen. Nach *Huchard* verursacht Nikotin einen allgemeinen Gefäßkrampf, der auch bei chronischer Nikotinvergiftung noch auftritt. Bei der letzteren treten neben Störungen des allgemeinen Wohlbefindens und neben Herzstörungen sehr häufig Augenstörungen auf. Bei akuter Nikotinvergiftung erfolgt der Tod durch Lähmung des Atemzentrums; auch eine Einwirkung auf das Herz ist stets vorhanden, wenn auch diese meist nicht zum Tode führt.

Reaktionen des Nikotins.

Nikotin läßt sich der wässerig-alkalischen Lösung mit Äther oder niedrig siedendem Petroläther entziehen und bleibt dann beim freiwilligen Eindunsten derartiger Lösungen als eine ölige Flüssigkeit von Tabaksgeruch und stark alkalischer Reaktion zurück. Durch die meisten der allgemeinen Alkaloidreagentien wird es noch in größerer Verdünnung ausgefällt als Coniin. Phosphormolybdänsäure und Wismutjodidjodkalium fällen Nikotin noch in einer Verdünnung von 1 : 40.000, Quecksilberjodidjodkalium bei 1 : 15.000, Goldchlorid bei 1 : 10.000 und Platinchlorid bei 1 : 5000. Spezielle Reaktionen auf Nikotin sind die folgenden:

1. Eine salzsaure Nikotinlösung hinterläßt beim Eindunsten in einem Uhrschälchen einen gelblichen, firnisartigen Rückstand, der auch bei mikroskopischer Untersuchung völlig amorph erscheint (Unterschied von salzsaurem Coniin) und der erst bei längerem Stehenlassen über Schwefelsäure im Exsikkator eine undeutlich kristallinische Struktur annimmt.

2. *Roussin*sche Kristalle. Läßt man die Lösung einer Spur Nikotin in Äther mit dem gleichen Volumen einer ätherischen Jodlösung in einem trockenen Probierrohre verschlossen stehen, so trübt sich die Mischung alsbald, oder es scheidet sich allmählich ein braunroter, harziger Niederschlag aus, der mit der Zeit kristallinisch wird. Im Laufe kürzerer oder längerer Zeit bilden sich in der ätherischen Lösung lange, rubinrot gefärbte, im reflektierten Lichte dunkelblau schillernde Kristallnadeln: *Roussin*sche Kristalle. Mit altem, stark verharztem Nikotin erhält man die *Roussin*schen Kristalle in der Regel nicht mehr.

3. *Melzer*sche Reaktion.[1]) Erhitzt man einen Tropfen Nikotin mit 2 bis 3 *cm* Epichlorhydrin zum Sieden, so färbt sich das Gemisch deutlich rot. Coniin gibt unter den gleichen Bedingungen keine Färbung.

---

[1]) Zeitschr. d. allg. österr. Apothekervereines. 54. 65.

4. *Schindelmeiser*sche Reaktion.[1]) Versetzt man unverharztes Nikotin erst mit einem Tropfen ameisensäurefreier Formaldehydlösung, dann mit einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure, so färbt sich das Gemisch intensiv rosarot. Läßt man das Gemisch von Nikotin und Formaldehyd erst einige Stunden stehen, so bildet sich ein fester Rückstand, der mit einem Tropfen Salpetersäure die Färbung noch schöner zeigt. Man nehme wenig Formaldehyd, weil sich sonst die Lösung nach einiger Zeit grün färbt, und verpufft.

Trimethylamin, Piperidin, Pyridin, Pikolin, Chinolin und Anilin geben unter diesen Umständen keine Färbung. Extrakte aus faulendem Pferdefleisch und den Eingeweiden von Tieren, welche mit Arsen oder Quecksilber vergiftet worden waren, gaben die beschriebene Reaktion nicht, wenigstens dann nicht, als die Extrakte der betreffenden Kadaverteile nach dem Verfahren von *Stas-Otto* verarbeitet wurden.

5. Physiologischer Versuch. Handelt es sich um den Nachweis sehr kleiner Mengen Nikotin, so wird man neben dem chemischen auch den physiologischen Nachweis führen müssen, der am Frosch schon bei sehr kleinen Dosen Nikotin ein sehr charakteristisches Vergiftungsbild, nämlich erst Reizung, dann Lähmung des Gehirns und der Atemmuskeln und scheinbare Kurarisierung (tetanische Konvulsionen) ergibt. Man studiere erst die Giftwirkung mit reinem Nikotin. Auch der Versuch am Froschherzen — zeitweiser diastolischer Stillstand — ist charakteristisch.

Anilin.

Anilin, $C_6H_5NH_2$, bleibt beim Eindunsten des Ätherauszuges der wässerig-alkalischen Flüssigkeit in Form von gelb, rötlich oder bräunlich gefärbten Öltröpfchen zurück. Diese löst man unter tüchtigem Umschütteln in Wasser auf und prüft die erhaltene Lösung auf einen Gehalt an Anilin. Eine weitere Probe besteht darin, daß man einige der erhaltenen Öltröpfchen direkt in einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure löst und wenig Kaliumbichromatlösung zufügt. Bei Vorhandensein von Anilin entsteht eine vorübergehende blaue Färbung.

Veratrin.

Das offizinelle Veratrin besteht aus einem sehr innigen Gemisch zweier isomeren Alkaloide von der Zusammensetzung $C_{32}H_{49}NO_9$, nämlich aus dem im Wasser nahezu unlöslichen, aber kristallisierbaren Cevadin, auch kristallisiertes Veratrin genannt, und dem in Wasser löslichen, amorphen Veratridin = wasserlösliches Veratrin. Schon geringe Mengen des kristallisierbaren Alkaloids genügen, um auch das Veratridin wasserunlöslich zu machen, und andererseits verhindert das letztere das Kristallisieren des Cevadins. Es gelingt daher nicht, die kristallisierbare Base durch Umkristallisieren des offizinellen Veratrins aus Alkohol

[1]) *J. Schindelmeiser*, Zum Nachweis des Nikotins. Pharm. Centralhalle. **40**. 703 (1899).

oder einem anderen Lösungsmittel zu isolieren, noch das wasserlösliche Alkaloid durch einfaches Ausziehen mit Wasser daraus zu gewinnen.

Eigenschaften des offizinellen Veratrins. Das offizinelle Präparat bildet ein weißes, amorphes, nur unter dem Mikroskope kristallinisch erscheinendes Pulver, das brennend scharf schmeckt und dessen Staub sehr stark zum Nießen reizt. An Wasser, auch siedendes, gibt Veratrin nur sehr wenig ab; immerhin reagiert der wässerige Auszug des Veratrins schwach alkalisch. Es ist ferner ziemlich leicht löslich in Alkohol (1 : 4), Äther (1 : 10), Chloroform (1 : 2), sowie in Benzol und Amylalkohol. Alle diese Lösungen reagieren stark alkalisch. Das offizinelle Veratrin schmilzt bei 150 bis 155° zu einer gelblichen Flüssigkeit, die zu einer durchscheinenden, harzartigen Masse erstarrt. Aus seiner ätherischen Lösung hinterbleibt es als ein weißes, amorphes Pulver. Veratrin läßt sich aus schwachsaurer Lösung durch Äther in sehr geringer, durch Chloroform und Amylalkohol in erheblicherer Menge ausschütteln. Veratrin ist eine starke Base, die mit Säuren gegen Lackmus neutral reagierende, meist amorphe Salze bildet. Die mit salzsäurehaltigem Wasser hergestellte Lösung des Veratrins wird noch in einer Verdünnung von 1 : 5000 durch Phosphormolybdänsäure, Jod-Jodkalium, Gerbsäure und Quecksilberjodid-Jodkalium ausgefällt.

Konstitution. Durch Hydrolyse, nämlich durch Kochen mit gesättigtem Barytwasser oder mit alkoholischer Kalilauge, wird kristallisiertes Veratrin (Cevadin) in Angelikasäure und Cevin gespalten:

$$\underset{\text{Cevadin}}{C_{32}H_{49}NO_9} + H_2O = \underset{\text{Angelikasäure}}{C_5H_8O_2} + \underset{\text{Cevin.}}{C_{27}H_{43}NO_8}$$

Reaktionen des Veratrins.

1. Konzentrierte Schwefelsäure. Übergießt man eine Spur Veratrin mit einigen Tröpfchen konzentrierter Schwefelsäure, so färbt es sich gelb und löst sich beim Umrühren zu einer gelben, grüngelb fluoreszierenden Flüssigkeit auf; die gelbe Färbung geht allmählich in Orange, dann in Blutrot und bei längerem Stehen, nach $^1/_4$ bis $^1/_2$ Stunde in Kirschrot über. Gelindes Erwärmen über sehr kleiner Flamme beschleunigt diesen Farbenwechsel; die Lösung des Veratrins in der konzentrierten Schwefelsäure färbt sich dann sofort schön kirschrot.

Fröhdes und *Erdmanns* Reagens rufen ähnliche Farbenerscheinungen hervor wie konzentrierte Schwefelsäure.

2. Konzentrierte Salzsäure. Erwärmt man die mit 1 bis 2 *cm*³ kalter konzentrierter Salzsäure bereitete farblose Lösung des Veratrins in einem Probierröhrchen im kochenden Wasserbade etwa zehn Minuten lang, so färbt sie sich schön kirschrot. Diese Färbung hält sich mehrere Tage und tritt selbst mit 0·2 *mg* Veratrin noch deutlich ein.

3. Konzentrierte Salpetersäure löst Veratrin mit gelber Farbe auf.

4. Die *Weppen*sche Probe. Verreibt man 1 Teil Veratrin mit etwa 5 Teilen fein pulverisiertem Rohrzucker und fügt dann einige Tropfen

konzentrierte Schwefelsäure hinzu, so färbt sich die Mischung erst gelb und nach einiger Zeit vom Rande her grasgrün, später blau. Beim Anhauchen der Mischung tritt dieser Farbenwechsel schneller ein. Man vermeide einen zu großen Überschuß von Rohrzucker.

Nach *E. Laves*[1]) kann statt des Rohrzuckers eine wässerige Furfurollösung verwendet werden: Man mischt 3—4 Tropfen einer 1%igen wässerigen Furfurollösung mit 1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und bringt 3—5 Tropfen von dieser Mischung in der Weise mit der auf Veratrin zu prüfenden Substanz zusammen, daß diese nur am Rande mit dem Furfurol-Schwefelsäuregemisch in Berührung kommt. Bei Vorhandensein von Veratrin zieht sich von der Substanz aus in die Flüssigkeit ein dunkler Streifen, der am Ausgangspunkte blau neben blauviolett, in der Verlängerung grün gefärbt erscheint. Beim Mischen mit einem Glasstäbchen färbt sich die ganze Flüssigkeit dunkelgrün, nach einiger Zeit blau und schließlich violett. Gelindes Erwärmen begünstigt diesen Farbenwechsel.

5. *Grandeau*sche Reaktion. Die gelbe Lösung des Veratrins in konzentrierter Schwefelsäure färbt sich bei sofortigem Zusatz von 1 bis 2 Tröpfchen Bromwasser alsbald purpurfarben. — Die Färbung ist nahezu die gleiche, welche die Lösung des Alkoloids in konzentrierter Schwefelsäure allein annimmt, nämlich bei längerem Stehen oder sofort bei gelindem Erwärmen.

6. *Vitali*sche Reaktion. Dampft man in einem Porzellanschälchen eine Lösung des Veratrins in wenig rauchender Salpetersäure auf dem Wasserbade zur Trockne ein, so hinterbleibt ein gelblich gefärbter Rückstand, der sich nach dem Erkalten mit alkoholischer Kalilauge befeuchtet, orangerot oder rotviolett färbt und der beim Umrühren mit der gleichen Farbe in Lösung geht.

Atropin, Hyoscyamin, Skopolamin sowie Strychnin verhalten sich bei der *Vitali*schen Reaktion sehr ähnlich wie Veratrin.

Strychnin.

Strychnin, $C_{21}H_{22}N_2O_2$, findet sich neben Brucin in größerer Menge in den Brechnüssen, dem Samen von Nux vomica und den Ignatiusbohnen, und zwar sind diese beiden Strychnosalkaloide in den ersteren in einer Menge von 2·93—3·14%, in den letzteren zu 3·11—3·22% enthalten. Die freie Strychninbase bildet farblose, glänzende, bei 268° schmelzende Säulen des rhombischen Systems, die sich in 6600 Teilen kaltem und in 2500 Teilen heißem Wasser zu alkalisch reagierenden, sehr stark bitter schmeckenden Flüssigkeiten lösen. In absolutem Alkohol und in absolutem Äther ist Strychnin so gut wie unlöslich, während es von 160 Teilen kaltem und 12 Teilen siedendem Weingeist (von 90 Vol.%) gelöst wird; ebenso wird es von käuflichem Äther und von

[1]) Pharmazeutische Zeitung. **37**. 338.

Benzol gelöst, bei weitem am leichtesten aber von Chloroform, nämlich bei 15° von 6 Teilen Chloroform. Der sehr bittere Geschmack einer wässerigen Strychninlösung wird selbst noch in einer Verdünnung von 1 : 600000 deutlich wahrgenommen. Stychnin ist eine einsäurige Base, die sich mit einem Äquivalent Säure zu meist gut kristallisierenden, stark bitter schmeckenden, sehr giftig wirkenden Salzen vereinigt. Das bekannteste, auch arzneilich angewandte Strychninsalz ist das salpetersaure Strychnin, $C_{21}H_{22}NO_2N \cdot HNO_3$. Daß Strychnin eine einsäurige und zwar tertiäre Base ist, geht daraus hervor, daß es sich nur mit einem Molekül eines Alkylhaloids vereinigt, z. B. mit Methyljodid zu dem Strychninjodmethylat, $C_{21}H_{22}NO_2N \cdot CH_3J$. Mit Natriummethylat CH_3ONa in alkoholischer Lösung, geht Strychnin in Strychninsäure über, die nach ihrem chemischen Verhalten eine Iminokarbonsäure sein muß; beim Kochen ihrer mineralsauren Lösungen geht die Strychninsäure unter Verlust von 1 Mol. Wasser wieder in Strychnin über.

Physiologische Wirkung. Strychnin erhöht die Reflexerregbarkeit des Rückenmarks, des verlängerten Marks und des Gehirns. Schon die kleinsten Reize, besonders akustische, optische und taktile Reize, können bei größeren Strychnindosen heftige Reflexe auslösen. Ist die Strychnindose groß genug, so kann jeder dieser Reize Krampfanfälle zur Folge haben. Sehr große Dosen von Strychnin rufen beim Frosch und Warmblüter kurareartige Lähmung der Enden der motorischen Nerven hervor. Die Herzmuskulatur kann beeinflußt werden. Auf Leukozyten ist Strychnin insofern nicht ohne Einwirkung, als es deren Bewegungsfähigkeit verhindert, sie also starr macht. — Auch auf das Protoplasma von Pflanzen wirkt das Gift ein; wenigstens wird das Protoplasma der Mimosa pudica durch Strychnin in dem Sinne beeinflußt, daß die beweglichen Organe dieser Pflanze ihre Elastizität und Biegsamkeit verlieren. — Die Ausscheidung des Strychnins aus dem Organismus erfolgt, abgesehen von Speichel, Galle und Milch, hauptsächlich durch den Harn, und zwar beim Menschen in unverändertem Zustande. Die Ausscheidung beginnt schon in der ersten Stunde, wird nach zwei Tagen gering, endet aber viel später. Die Giftmenge des durch den Harn unverändert ausgeschiedenen Strychnins ist in kleinen Dosen prozentisch geringer als bei größeren Dosen, bei welchen 70—75% des Strychnins unzerstört bleiben. In Leber, Niere, Gehirn und Rückenmark kann das Strychnin unverändert aufgespeichert werden.

Nachweis des Strychnins.

Kalilauge, Natronlauge, Ammoniak und die Alkalikarbonate fällen aus den wässerigen Lösungen der Strychninsalze die freie Strychninbase in Form eines weißen, kristallisierten Niederschlages.

Strychnin läßt sich aus einer wässerig-alkalischen Flüssigkeit mit Äther ausschütteln und scheidet sich dann beim Eindunsten der ätherischen Lösung häufig in feinen Kristallnädelchen aus; am leichtesten geht es in

Chloroform über, welches Strychnin erheblich leichter löst als Äther. Die Strychninsalzlösungen geben mit den meisten der allgemeinen Alkaloidreagentien, auch noch bei starker Verdünnung, Niederschläge. Gerbsäure, Quecksilberjodidjodkalium und Phosphorwolframsäure geben weiße, Goldchlorid- und Phosphormolybdänsäure gelbe Niederschläge, während Jod-Jodkalium eine braune Fällung gibt. Den Verdunstungsrückstand der ätherischen Lösung hat man für die Reaktionen mit den allgemeinen Alkaloidreagentien erst in sehr stark verdünnter Salzsäure zu lösen.

Konzentrierte Schwefelsäure, *Erdmanns* und *Fröhdes* Reagens lösen ganz reines, brucinfreies Strychnin ohne Färbung auf. Konzentrierte Salpetersäure löst Strychnin mit gelblicher Farbe. Kaliumdichromat fällt aus Strychninsalzlösungen Strychnindichromat, $(C_{21}H_{22}N_2O_2)_2 \cdot H_2Cr_2O_7$, als gelben, aus feinen Kristallnadeln bestehenden Niederschlag, der beim Umkristallisieren aus heißem Wasser orangegelbe, glänzende Nadeln liefert. Ferricyankalium fällt aus Strychninsalzlösungen goldgelbes, kristallinisches Ferricyanstrychnin $(C_{21}H_{22}N_2O_2)_3 \cdot H_3Fe(CN)_6 \cdot 6H_2O$.

Spezielle Reaktionen des Strychnins.

1. Löst man in einem Uhrschälchen wenig Strychnin in 2 oder 3 Tröpfchen konzentrierter Schwefelsäure, fügt ein Stückchen Kaliumdichromat hinzu und drückt dieses mit Hilfe eines Glasstabes fest auf die Glaswand an, so fließen intensiv blau und blauviolett gefärbte Streifen vom Kaliumdichromat ab, wenn man das Uhrschälchen vorsichtig hin- und herbewegt. Durchrührt man alsdann das Gemisch mit einem Glasstabe, so färbt es sich vorübergehend schön blau oder blauviolett.

Man kann den Versuch auch in der Weise anstellen, daß man auf die Lösung des Strychnins in der konzentrierten Schwefelsäure einige Körnchen grob gepulvertes Kaliumchromat streut und mit einem Glasstäbchen umrührt. Die blaue bis blauviolette Farbenreaktion tritt hierbei sehr schön auf. — Die blaue Färbung ist nicht lange haltbar, denn sie geht alsbald in Rot und schließlich in ein schmutziges Grün über.[1])

Strychnindichromat und Strychninferricyanid geben diese Probe sehr schön. Will man einen erhaltenen Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges der alkalischen Flüssigkeit in das Chromat überführen, so übergießt man ihn mit einer sehr stark verdünnten Kaliumdichromatlösung, läßt die letztere einige Minuten einwirken, gießt sie dann ab, spült mit wenig kaltem Wasser nach, läßt gut abtropfen und führt den so erhaltenen noch feuchten Chromatrückstand mit Hilfe eines Glasstabes durch wenig konzentrierte Schwefelsäure. Bei Vorhandensein von Strychnin treten jetzt blaue und violette Streifen auf. — Man kann auch

[1]) Nach *J. Tafel*, Über Strychnin, Ann. d. Chem. 268, 233 (1892) soll die beschriebene Farbenreaktion für viele Anilide charakteristisch sein und durch die Gruppe .CO.N. bedingt werden.

den in der angegebenen Weise hergestellten Chromatrückstand direkt mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure befeuchten.

Mandelins Reagens, also Vanadinschwefelsäure, gibt diese Strychninprobe sehr schön, und zwar hält sich die blaue oder violette Färbung, die das Reagens mit Strychnin gibt, länger als beim Anstellen der Probe mit Kaliumdichromat. Schließlich geht die Färbung in Orangerot über.

An Stelle des Kaliumdichromats können auch andere Oxydationsmittel, wie Kaliumpermanganat, Bleisuperoxyd, Braunstein, Ferricyankalium, Ceroxyduloxyd und Vanadinsäure (*Mandelins* Reagens) verwendet werden. Es kann aber nicht Salpeter oder Salpetersäure genommen werden; diese verhindern sogar die beschriebene Strychninprobe: salpetersaures Strychnin gibt daher die Probe nicht.

2. Physiologischer Strychninnachweis. Man löst den fraglichen Verdunstungsrückstand, der aus der ätherischen Lösung zurückgeblieben ist, in einigen Kubikzentimeter sehr stark verdünnter Salzsäure auf, dunstet die filtrierte Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in etwa 1 cm^3 Wasser auf und spritzt diese Lösung in den Lymphsack eines kräftigen Frosches ein. Man setzt dann den Frosch in ein größeres Becherglas, das man nur lose bedeckt. Falls Strychnin vorhanden ist, treten beim Frosche Vergiftungserscheinungen auf, und zwar je nach der Menge Strychnin schon nach wenigen Minuten oder erst nach etwa einer halben Stunde. Strychnin steigert die Reflexerregbarkeit nicht für alle Arten von Reiz, sondern nur für taktile, für optische und besonders für akustische Reize. Jeder dieser Reize kann, falls die Strychnindose groß genug ist, Krampfanfälle zur Folge haben. Berührt man beispielsweise das Becherglas, in dem sich der „Strychninfrosch" befindet, ganz leise, so genügt schon dieser schwache akustische Reiz, um einen Krampfanfall auszulösen. Vgl. Näheres bei *Fühner*, Biologischer Nachweis der Gifte.

Nachweis des Strychnins neben Brucin.

Liegen mehr als Spuren von Brucin vor, so verhindern diese den Nachweis des Strychnins mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat. Mit dem *Mandelin*schen Reagens tritt die Strychninprobe neben Brucin unter Umständen noch mehr oder weniger deutlich ein.

Will man Strychnin selbst neben viel Brucin sicher nachweisen, so löst man den brucinhaltigen Alkaloidrückstand, den die Ätherlösung hinterlassen hat, in etwa 2 cm^3 verdünnter Schwefelsäure, fügt 2 Tropfen konzentrierte Salpetersäure zu und läßt das Gemisch 4 Stunden kalt stehen. Nun macht man mit Natronlauge stark alkalisch und schüttelt mit Äther tüchtig aus. Beim Eindunsten der Ätherlösung bleibt brucinfreies oder nahezu brucinfreies Strychnin zurück, das die Strychninproben mit Schwefelsäure und Kaliumbichromat sowie mit *Mandelins* Reagens sehr schön gibt, falls das Untersuchungsmaterial Strychnin enthalten hat.

Brucin.

Brucin, $C_{23}H_{26}N_2O_4$, kristallisiert in wasserhellen, monoklinen Prismen oder in glänzenden Blättchen, und zwar aus Wasser entweder mit 4 oder 2 Mol., aus Alkohol mit 2 Mol. Kristallwasser. Es schmilzt nur wenige Grade über 100° in seinem Kristallwasser, während der Schmelzpunkt der wasserfreien Base bei 178° liegt. Brucin ist in Wasser und in Alkohol leichter löslich als Strychnin und bleibt deshalb in den Mutterlaugen von der Strychnindarstellung gelöst. Auch die Löslichkeit des Brucins in Äther ist größer als diejenige des Strychnins. Die Brucinlösungen schmecken stark bitter und reagieren alkalisch. Von Benzol, besonders aber von Chloroform und Amylalkohol wird Brucin reichlich gelöst. Im Unterschiede zum Strychnin bleibt Brucin aus seiner Ätherlösung beim Eindunsten in der Regel amorph zurück.

Brucin ist eine einsäurige, tertiäre Base, die als solche mit je einem Äquivalent Säure zum Teil kristallisierende Salze und mit je 1 Mol. eines Alkyljodids Additionsprodukte, z. B. mit Methyljodid das Brucinjodmethylat, $C_{23}H_{26}NO_4N \cdot CH_3J$, bildet.

Mit Hilfe der *Zeisel*schen Methode lassen sich im Molekül des Brucins zwei Methoxylgruppen nachweisen.

Nachweis des Brucins.

Brucin läßt sich aus wässerig-alkalischer Flüssigkeit mit Äther, Benzol oder Chloroform ausschütteln, und zwar bleibt es beim Eindunsten des Ätherauszuges meist amorph zurück. Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien zeichnen sich gegen Brucin durch eine größere Empfindlichkeit aus: Jod-Jodkalium (1 : 50000), Quecksilberjodid-Jodkalium (1 : 30.000), Goldchlorid (1 : 20000), Wismutjodid-Jodkalium (1 : 5000), Phosphormolybdänsäure, Gerbsäure (1 : 2000) und Platinchlorid (1 : 1000).

1. Konzentrierte Salpetersäure löst Brucin und seine Salze mit blutroter Farbe, die alsbald in Rotgelb und schließlich in Gelb übergeht. Versetzt man die gelbrot oder gelb gewordene Lösung in einem Probierröhrchen tropfenweise mit verdünnter Zinnchlorürlösung, so nimmt sie eine schöne Violettfärbung an. Erwärmt man nun die Lösung, so kommt die rotgelbe Färbung in der Regel wieder zum Vorschein, um auf erneuten Zusatz von wenig Zinnchlorürlösung wieder prächtig violett zu werden. Diese Probe tritt um so schöner ein, je weniger Salpetersäure zum Lösen des Brucins genommen wird.

Statt der Zinnchlorürlösung kann auch farbloses Schwefelammonium verwendet werden.

2. Nach *R. Mauch* verläuft diese Reaktion außerordentlich schön, wenn man in der folgenden Weise arbeitet: Man versetzt in einem Probierröhrchen ca. 0·5 cm^3 der Lösung des Brucins in 60%iger Chloralhydratlösung mit sehr wenig verdünnter Salpetersäure, mischt gut und schichtet dieses

Gemisch auf das dreifache Volumen konzentrierter Schwefelsäure: es tritt sofort eine gelbrote bis tiefrote Zone auf. Ist die obere Schicht nach einiger Zeit gelb geworden, so schichtet man mit Hilfe einer Pipette vorsichtig wenig verdünnte Zinnchlorürlösung[1]) darüber. Hierbei tritt zwischen den beiden oberen Schichten eine prachtvoll violett gefärbte Zone auf, die an Stärke zunimmt, wenn man das Röhrchen leicht hin und her bewegt.

Atropin.

Atropin, $C_{17}H_{23}NO_3$, kristallisiert in glänzenden, spießigen, bei 115° schmelzenden Nadeln, die von 600 Teilen Wasser von 15°, von 50 Teilen Äther und von 3·5 Teilen Chloroform gelöst werden; auch von Alkohol, Amylalkohol und Benzol wird es reichlich gelöst. Die wässerige Lösung des Alkaloids reagiert alkalisch und besitzt einen lange anhaltenden unangenehm bitteren Geschmack. Im Unterschiede zum isomeren, aber linksdrehenden Hyoscyamin ist Atropin optisch inaktiv.

Konstitution. Beim Erhitzen mit Salzsäure auf 120—130° zerfällt Atropin in Tropasäure und Tropin.

Wird das Alkaloid mit Barytwasser gekocht, so entsteht statt der Tropasäure die um 1 Mol. Wasser ärmere Atropasäure.

Der Stickstoff im Atropin ist tertiär gebunden. Hyoscyamin ist stereoisomer mit Atropin; beim Erhitzen des ersteren unter Luftabschluß auf 110° oder beim bloßen Stehenlassen in alkoholischer Lösung unter Zusatz einiger Tropfen Alkalilauge wird Hyoscyamin in das inaktive Atropin umgewandelt. Höchstwahrscheinlich ist Atropin die razemische Form, während Hyoscyamin die linsdrehende Modifikation dieser isomeren Basen vorstellt. Für Hyoscyamin ist $[\alpha]_D = -20·97°$. Gegen allgemeine Alkaloidreagenzien und gegen konzentrierte Schwefelsäure beim Erhitzen verhält sich Hyoscyamin wie Atropin und gibt auch wie dieses die *Vitali*sche Reaktion (siehe unten).

Fäulnis. Nach Untersuchungen von *Ipsen*[2]) ist Atropin gegen Fäulnis sehr widerstandsfähig; es gelang, das Alkaloid, das in einer Menge von 0·03 *g* als Sulfat in je 300 *cm*³ Blut, Harn und Bier oder als reines Atropin in 300 *cm*³ Blut zersetzenden Einflüssen ausgesetzt war, noch nach 2 Jahren nachzuweisen.

Reaktionen des Atropins.

Atropin kann aus einer mit Natronlauge oder Sodalösung alkalisch gemachten Flüssigkeit mit Äther, Benzol oder Chloroform ausgeschüttelt werden.

Hat man bei einer toxikologischen Untersuchung speziell auf Atropin zu fahnden, so schüttelt man es aus der mit Natriumkarbonat alka-

[1]) Bereitet durch Auflösen von 1 Teil Zinnchlorür in 9 Teilen Salzsäure vom spez. Gew. 1·12.

[2]) Vierteljahrsschrift für gerichtliche Medizin und öffentliches Sanitätswesen. 31. 308.

lisch gemachten wässerigen Flüssigkeit mit Chloroform aus, weil dieses das Alkaloid erheblich leichter löst als Äther. Mit dem aus der Äther- oder Chloroformlösung erhaltenen, meist nicht kristallinischen Rückstande führt man die unten verzeichneten Proben aus.

Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien zeichnen sich durch eine größere Empfindlichkeit für Atropin aus: Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure (1:10.000), Goldchlorid, Phosphorwolframsäure, Quecksilberjodidjodkalium, Wismutjodidjodkalium. — Pikrinsäure fällt aus nicht zu verdünnten Atropinsalzlösungen gelbe Blättchen von Atropinpikrat und Platinchlorid monokline Prismen.

1. *Vitali*sche Reaktion. Dampft man in einem Porzellanschälchen Atropin mit einigen Tropfen rauchender Salpetersäure auf dem Wasserbade zur Trockne ein, so hinterbleibt ein gelblich gefärbter Rückstand, der sich beim Befeuchten mit alkoholischer Kalilauge vorübergehend violett färbt.

Hyoscyamin und Skopolamin geben ebenfalls die *Vitali*sche Atropinreaktion. Strychnin und Veratrin verhalten sich ähnlich. Nur bei Abwesenheit der beiden letzteren Alkaloide ist somit die *Vitali*sche Reaktion charakteristisch für die Atropaalkaloide.

2. Erhitzt man in einem trockenen Reagenzgläschen wenig Atropin bis zum Auftreten weißer Nebel, so macht sich ein angenehmer Geruch bemerkbar; versetzt man hierauf mit 1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure, erwärmt bis zur Bräunung der Säure und verdünnt sofort mit etwa 2 cm^3 Wasser, so tritt während des Aufschäumens ein intensiver, süßlicher und honigähnlicher Geruch auf; diese, früher einzig bekannte Probe auf Atropin gelingt noch mit 0·01 *g* Atropin.

3. Physiologischer Nachweis. Die sehr charakteristische Wirkung des Atropins auf die Pupille des Auges kann ebenfalls zum Nachweise des Atropins herangezogen werden. Die Erweiterung der Pupille tritt noch durch einen Tropfen einer sehr stark verdünnten Atropinlösung (1:130000) ein. Will man mit dem Ätherrückstande diesen Versuch ausführen, so löst man ein Teilchen desselben in 4—5 Tröpfchen einer sehr verdünnten Schwefelsäure auf und bringt 1 Tropfen dieser Lösung in das eine Auge eines Hundes oder einer Katze. Die Erweiterung der Pupille hält oft viele Stunden an. Die größte Vorsicht bei der Ausführung dieses Versuches ist geboten, falls man mit dem Auge des Menschen operiert.

Homatropin.

Homatropin, $C_{16}H_{21}O_3N$, ist der Tropinester der Phenylglykolsäure oder Mandelsäure. Das bromwasserstoffsaure Salz des Homatropins wird an Stelle des Atropins arzneilich verwendet, da seine Wirkung auf die Pupille ungefähr so stark ist wie diejenige des natürlichen Alkaloids, aber den Vorteil hat, weit rascher, nämlich in 12—24 Stunden, zu verschwinden, während die Atropinwirkung oft mehrere Tage lang anhält.

Auch seine Giftigkeit ist geringer als die des Atropins. Homatropin ist eine starke tertiäre Base, die mit Säuren neutral reagierende Salze bildet und die *Vitali*sche Probe gibt. Homatropin schmilzt bei 92—96°, Hyoscyamin bei 108° und Atropin bei 115·5°.

Kokain.

Kokain, $C_{17}H_{21}NO_4$, kristallisiert aus Alkohol in großen, farblosen, bei 98° schmelzenden, monoklinen Säulen, schmeckt schwach bitter und ruft auf der Zunge eine vorübergehende Gefühllosigkeit hervor. Kokain ist in Wasser schwer (1 : 700), in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol und Essigäther aber leicht löslich. Die Kokainlösungen reagieren stark alkalisch und drehen die Ebene des polarisierten Lichtstrahles nach links. Von verdünnten Säuren wird Kokain zu meist gut kristallisierenden Salzen gelöst und aus derartigen Salzlösungen wird es durch Alkalilauge, Ammoniak und Alkalikarbonate wieder frei gemacht und ausgefällt.

Kokain ist eine einsäurige tertiäre Base, da es sich mit je einem Äquivalent einer Säure zu Salzen und mit je einem Molekül eines Alkyljodids zu Ammoniumjodiden verbindet.

Verhalten im Tierkörper. Nach Tierversuchen werden vom Hund nur etwa 5% des Kokains durch die Nieren als solches ausgeschieden und vom Kaninchen überhaupt nichts. Da der Harn dieser Tiere auch kein Ecgonin enthält, ist zu vermuten, daß Kokain im tierischen Organismus weitgehend zersetzt wird. Das gleiche erfolgt im menschlichen Organismus. In Leichenteilen läßt sich Kokain nach *H. Proells* höchstens noch nach 14 Tagen nachweisen; im lebenden Organismus soll es rasch in Ecgonin übergeführt werden.

Nachweis des Kokains.

Kokain läßt sich aus einer wässerig-alkalischen Flüssigkeit mit Äther, Chloroform oder Benzol ausschütteln. Von den meisten allgemeinen Alkaloidreagenzien werden Kokainsalzlösung selbst noch in starker Verdünnung ausgefällt; durch größere Empfindlichkeit für Kokain zeichnen sich aus: Jodjodkalium, Phosphormolybdän-, Phosphorwolframsäure, Quecksilberjodidjodkalium, Wismutjodidjodkalium, Gold-, Platinchlorid und Pikrinsäure.

Reine konzentrierte Schwefelsäure, konzentrierte Salpetersäure, *Erdmanns* Reagens, *Fröhdes* und *Mandelins* Reagens (Vanadinschwefelsäure) lösen Kokain ohne Färbung auf.

Spezielle Reaktionen.

1. Eine nicht zu verdünnte, wässerige Kokainlösung gibt mit 1 bis 2 Tropfen Kalilauge eine weiße, milchige Trübung, aus der sich zunächst harzige Öltröpfchen, später feine Kristallnadeln von freiem Kokain vom Schmelzpunkt 98° abscheiden.

Den Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges der wässerig-alkalischen Flüssigkeit löse man erst in einigen Tröpfchen verdünnter Salzsäure auf, füge tropfenweise Kalilauge im Überschusse hinzu und kühle das Gemisch gut ab, am besten durch Einstellen in Eis. Man muß bestrebt sein, das Kokain in dem Grade der Reinheit zu erhalten, daß sein Schmelzpunkt bestimmt werden kann. Im übrigen ist diese Reaktion für Kokain nicht charakteristisch, da ja die meisten Alkaloide aus ihren Salzlösungen durch überschüssige Kalilauge gefällt werden.

2. Gesättigte Kaliumpermanganatlösung fällt aus einer konzentrierten, wässerigen Kokainsalzlösung violett gefärbtes, kristallinisches Kokainpermanganat. Liegt freie Kokainbase vor — Verdunstungsrückstand der Ätherlösung — so löse man diesen in einigen Tröpfchen verdünnter Salzsäure auf, verdunste die Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne, nehme den Rückstand in möglichst wenig Wasser auf und prüfe dann mit Permanganatlösung.

3. Versetzt man eine nicht zu verdünnte Kokainsalzlösung tropfenweise mit 5%iger Chromsäure oder entsprechend konzentrierter Kaliumdichromatlösung, so verursacht jeder einfallende Tropfen einen Niederschlag, der sich beim Umschütteln sofort wieder löst; fügt man alsdann zu der klaren Lösung etwa 1 cm^3 konzentrierte Salzsäure, so scheidet sich ein orangefarbener, mehr oder weniger kristallinischer Niederschlag aus.

4. Nachweis der Benzoylgruppe im Kokain. Für diesen Nachweis sind mindestens 0·2 *g* Kokain erforderlich. Man erwärmt das Kokain in einem Probierröhrchen einige Minuten mit etwa 2 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure im kochenden Wasserbade und fügt nach dem Erkalten unter Abkühlen tropfenweise Wasser hinzu; es erfolgt eine weiße, kristallinische Abscheidung von Benzoesäure, welche nach dem Trocknen durch Sublimation oder, bei genügender Menge, durch Bestimmung des Schmelzpunktes (120°) als solche erkannt wird. Man kann auch die Benzoesäure mit Äther ausschütteln; erhitzt man dann den Ätherrückstand mit etwa 1 cm^3 absolutem Alkohol und der gleichen Menge konzentrierter Schwefelsäure, so tritt der charakteristische Geruch des Benzoesäureäthylesters, $C_6H_5COOC_2H_5$, auf.

5. Physiologischer Nachweis. Man löse die in Frage kommende Substanz — Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges von der wässerig-alkalischen Flüssigkeit — in einigen Tröpfchen verdünnter Salzsäure auf, dunste die Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne ein und bringe einen Tropfen der wässerigen Lösung des Rückstandes auf die Zunge. Bei Vorhandensein von Kokain macht sich auf der Zunge eine vorübergehende Gefühllosigkeit bemerkbar.

Nach *R. Kobert* (Intoxikationen) benutze man zur physiologischen Identifizierung des Kokains kleinere Frösche, die hinreichend empfindlich sind. Man beobachte die Pupillenerweiterung und Starre der Pupillen, Erweiterung der Lidspalte sowie die Erregbarkeit des Nervensystems.

Einige Kontrolltiere vergifte man zum Vergleiche mit analogen Dosen von salzsaurem Kokain.

Physostigmin.

Physostigmin, auch Eserin genannt, $C_{15}H_{21}N_3O_2$, findet sich in den Kalabarbohnen, den Samen von Physostigma venenosum, kristallisiert aus Benzol beim freiwilligen Verdunstenlassen in großen, bei 105° schmelzenden, anscheinend rhombischen Kristallen. Es ist nur wenig löslich in Wasser, aber leicht löslich in Alkohol, Äther, Benzol und Chloroform. Die Physostigminlösungen reagieren stark alkalisch, sind fast geschmacklos und linksdrehend. Physostigmin ist eine starke, einsaurige, tertiäre Base, die mit Säuren nur schwer kristallisierbare, zersetzliche Salze bildet. Die Lösungen des Alkaloids, namentlich die sauren und alkalischen, färben sich durch Belichtung und beim Erwärmen rot. Wegen dieser leichten Zersetzlichkeit des Physostigmins ist bei seiner Isolierung der Zutritt von Licht, Luft sowie höhere Temperatur zu vermeiden. Auch freie Mineralsäuren und ätzende Alkalien müssen möglichst ausgeschlossen werden.

Konzentrierte Schwefelsäure und konzentrierte Salpetersäure lösen Physostigmin mit gelber, alsbald in Olivengrün übergehender Färbung. Mit rauchender Salpetersäure auf dem Wasserbade eingedampft, liefert Physostigmin einen, am Rande grün gefärbten Rückstand, der in Wasser, Alkohol und Schwefelsäure mit grüner Farbe löslich ist.

Nachweis des Physostigmins.

1. Verdunstet man ein Physostigminsalz mit Ammoniak auf dem Wasserbad zur Trockne, so hinterbleibt ein mehr oder weniger blau gefärbter Rückstand; war nur sehr wenig Alkaloid vorhanden, so ist dieser Rückstand grünlich gefärbt. Der blaue Rückstand gibt mit Alkohol eine blau gefärbte Lösung, die beim Ansäuern mit verdünnter Mineralsäure oder Essigsäure eine rote Farbe und starke Fluoreszenz zeigt. Die blaue, alkalische Lösung zeigt im Spektrum in Rot, die rote, saure Lösung in Gelb je einen Absorptionsstreifen.

Der beim Eindunsten mit Ammoniak bleibende blaue Rückstand wird von 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure mit grüner Farbe gelöst, die beim Verdünnen mit Alkohol in Rot übergeht; läßt man den Alkohol verdunsten, so kommt wieder die ursprünglich grüne Färbung zum Vorschein.

2. Bildung von Rubreserin, $C_{13}H_{16}N_2O_2$. Schüttelt man eine wässerige Physostigminsalzlösung mit überschüssiger Kali- oder Natronlauge längere Zeit, so entsteht ein roter Farbstoff, Rubreserin genannt, der sich in roten Nadeln ausscheidet und bei weitergehender Oxydation grünlichblau färbt, indem Eserinblau entsteht. An Stelle der Alkalilauge kann auch Barytwasser genommen werden; hierbei entsteht zunächst eine weiße Fällung, die sich beim Schütteln, unter Umständen schon in der Kälte, sicher aber beim Aufkochen unter Schütteln alsbald rot färbt

3. Physiologischer Nachweis. Sehr charakteristisch für Physostigmin ist die stark pupillenverkleinernde Wirkung des Alkaloids. Der Versuch wird am besten am Auge einer Katze ausgeführt: die Pupillenverkleinerung ist noch bei 0·1 *mg* Physostigmin wahrzunehmen.

Kodein.

Kodein, Methylmorphin, $C_{17}H_{18}(CH_3)NO_3$, kristallisiert aus Wasser oder wasserhaltigem Äther in farblosen, durchsichtigen, oft sehr großen Oktaedern, die in Wasser ziemlich leicht löslich sind; 1 Teil Kodein wird bei 15° von 80 Teilen, bei 100° von 15 Teilen Wasser gelöst. Durch diese verhältnismäßig große Löslichkeit in Wasser unterscheidet sich das Kodein von den meisten anderen Alkaloiden, z. B. vom Morphin. — Auch Alkohol, Äther, Amylalkohol, Benzol und Chloroform lösen Kodein reichlich auf, während es in Petroläther nahezu unlöslich ist. Die wässerige Kodeinlösung reagiert stark alkalisch und schmeckt wie auch diejenige seiner Salze stark bitter. — Reines Kodein reduziert Jodsäure nicht und ruft in einer Mischung von Ferricyankalium und Eisenchloridlösung nicht sofort eine blaue Färbung oder einen blauen Niederschlag hervor. Auch mit Eisenchloridlösung allein färbt sich eine reine Kodeinlösung nicht blau. Durch diese Reaktionen unterscheidet sich Kodein vom Morphin. Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien fällen besonders Phosphormolybdänsäure, Jodjodkalium, Kaliumwismutjodid und Kaliumquecksilberjodid auch sehr stark verdünnte Kodeinlösung aus. — Gerbsäure, Pikrinsäure, Goldchlorid und Platinchlorid sind dem Kodein gegenüber weniger empfindlich.

Reaktion des Kodeins.

1. Konzentrierte Schwefelsäure löst reines Kodein ohne Färbung auf; bei mehrtägigem Stehenlassen in der Kälte, wie auch bei gelindem Erwärmen, färbt sich eine solche Lösung rötlich oder bläulichviolett. — Erhitzt man die Lösung des Kodeins in konzentrierter Schwefelsäure auf etwa 150°, so färbt sie sich nach dem Erkalten mit einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure tiefrot.

2. Salpetersäure von 25% HNO_3 löst Kodein unter Bildung von Nitrokodein mit gelber, alsbald in Rot übergehender Farbe. — Konzentrierte Salpetersäure löst Kodein mit rotbrauner Farbe auf.

3. Verreibt man Kodein in einem Uhrschälchen mit der drei- bis vierfachen Menge fein gepulvertem arsensauren Kalium, AsO_4KH_2, sowie mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und erwärmt das Gemisch über kleiner Flamme gelinde, so färbt es sich tiefblau oder, falls weniger reines Kodein vorgelegen hat, mehr blauviolett. Auf Zusatz von Wasser oder Natronlauge geht die blaue Farbe in Orangegelb über. — Ein Überschuß an arsensaurem Kalium beeinträchtigt diese Probe nicht.

Statt des arsensauren Kaliums kann auch eine Spur Eisenchlorid genommen werden. Nach Vorschrift des „Arzneibuchs f. d. Deutsche Reich"

soll zur Erkennung des Kodeins im Codeinum phosphoricum eine Schwefelsäure verwandt werden, welche in 10 *cm*³ einen Tropfen offizinelle Eisenchloridlösung enthält.

4. *Fröhdes* Reagens löst Kodein mit gelblicher, alsbald in Grün und schließlich in Blau übergehender Farbe; gelindes Erwärmen der Lösung über kleiner Flamme beschleunigt diesen Farbenwechsel.

Nach *R. Mauch* erwärmt man 2 bis 3 Tropfen der Kodeinchlorallösung mit 1 Tropfen „Fröhde“, wobei schließlich eine intensive Blaufärbung zustande kommt.

5. Formalinschwefelsäure[1]) löst Kodein erst mit rötlichvioletter Farbe, die alsbald in Blauviolett übergeht. Diese Färbung hält lange an; das Spektrum zeigt eine Auslöschung von Orange und Gelb.

6. Erwärmt man eine Lösung von Kodein in wenig konzentrierter Schwefelsäure mit einem Tröpfchen Zuckersirup gelinde, so färbt sie sich purpurrot. Ein Überschuß an Zuckersirup ist zu vermeiden. — Oder man löst das Kodein in einem Probierröhrchen in ca. 5 Tropfen 50- bis 60%iger Chloralhydratlösung auf, mischt einen Tropfen Zuckersirup darunter und unterschichtet 1 bis 2 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure; es entsteht eine recht haltbare, karminrot gefärbte Ringzone, welche beim Stehen an Intensität zunimmt. Schüttelt man sofort nach dem Unterschichten der Schwefelsäure tüchtig durch, so färbt sich die ganze Flüssigkeit rot, macht aber meistens nach einiger Zeit einer mehr rotbraunen Färbung Platz.

7. *Pellagri*sche Reaktion. Kodein gibt diese Reaktion geradeso schön wie Morphin. Man löst das Kodein in konzentrierter Salzsäure unter Zugabe von 3 bis 4 Tröpfchen konzentrierter Schwefelsäure, verdampft die Salzsäure auf dem Wasserbade und erhitzt dann noch ¼ Stunde lang darauf; den schmutzigrot oder violett gefärbten Rückstand, der hierbei bleibt, löst man in 2 bis 3 *cm*³ Wasser, fügt einige Tropfen Salzsäure hinzu und neutralisiert mit Natriumbikarbonat. Jetzt läßt man 2 bis 3 Tropfen alkoholische Jodlösung vorsichtig zutropfen und schüttelt einige Minuten tüchtig durch. Eine hierbei auftretende smaragdgrüne Färbung der Lösung zeigt dann Kodein an. Schüttelt man die grüne Lösung mit Äther aus, so färbt sich dieser rot, während die wässerige Flüssigkeit ihre grüne Farbe beibehält. — Diese Reaktion ist eine Probe des Apomorphins, das aus dem Kodein unter dem Einflusse der Mineralsäure entsteht:

$$\underset{\text{Kodein}}{C_{17}H_{18}(CH_3)NO_3} + HCl = \underset{\text{Apomorphin.}}{C_{17}H_{17}NO_2} + CH_3Cl + H_2O$$

8. Selenigsäure-Schwefelsäure[1]) löst Kodein mit blauer, rasch smaragdgrün, später dauernd olivgrün werdender Farbe.

Narkotin.

Narkotin, $C_{22}H_{23}NO_7$, kristallisiert in glänzenden Prismen oder in büschelförmig vereinigten Nadeln, die in kaltem Wasser fast unlöslich sind.

[1]) Vgl. „Die Bereitung der Reagenzien“, S. 813.

sich aber in siedendem Alkohol und in Chloroform leicht lösen. Beim Erkalten der alkoholischen Lösung scheidet sich Narkotin fast vollständig wieder ab. Es wird ferner bei 15° von 170 Teilen Äther, von 31 Teilen Essigäther und von 22 Teilen Benzol gelöst. Narkotin zeigt in Lösungen keine alkalische Reaktion und keinen bitteren Geschmack, wodurch es sich von den anderen Opiumalkaloiden wesentlich unterscheidet.

Die Salze des Narkotins kristallisieren nicht, sind nur wenig beständig und ihre Lösungen reagieren sauer. Diejenigen Salze, welche mit flüchtigen Säuren hergestellt sind, zersetzen sich beim Eindampfen ihrer Lösungen unter Abscheidung von Narkotin. Natriumacetat fällt aus der salzsauren Lösung des Alkaloids die freie Narkotinbase aus.

Nachweis des Narkotins.

Infolge der schwach basischen Natur des Narkotins kann es aus der wässerig-weinsauren Lösung mit Chloroform vollständig ausgeschüttelt werden. Durch dieses Verhalten läßt sich Narkotin von den anderen Opiumalkaloiden sowie auch von anderen Alkaloiden trennen. Selbstverständlich geht Narkotin auch aus der wässerig-alkalischen Flüssigkeit in Äther und in Chloroform über. Beim Eindunsten der ätherischen Lösung bleibt es meist als eine nur wenig gefärbte, firnisartige Masse zurück, die bei längerem Stehen strahlig-kristallinisch erstarrt. — Salzsaure und schwefelsaure Narkotinlösungen werden von Jod-Jodkalium, Phosphormolybdänsäure, Quecksilberjodid- und Wismutjodidjodkalium auch noch in größerer Verdünnung (1:5000) ausgefällt.

Spezielle Reaktionen des Narkotins.

1. Konzentrierte Schwefelsäure löst Narkotin beim Umrühren mit grünlich-gelber Farbe, die allmählich in Rotgelb und schließlich nach einigen Tagen in Himbeerrot übergeht.

2. Verdünnte Schwefelsäure. Dunstet man in einem Porzellanschälchen eine Lösung des Narkotins in verdünnter Schwefelsäure (1:5) auf dem Wasserbade oder über einer kleinen Flamme ein, so färbt sie sich rotgelb, dann bei stärkerem Erhitzen karmoisinrot; wenn die Säure zu verdampfen beginnt, treten vom Rande aus blauviolette Streifen auf und die ganze Flüssigkeit färbt sich schließlich schmutzig rotviolett (Reaktion von *Dragendorff*). Die gleichen Farbenerscheinungen kann man beobachten, wenn man die gelb gewordene Lösung des Narkotins in konzentrierter Schwefelsäure sehr vorsichtig erhitzt.

3. *Fröhdes* Reagens löst Narkotin mit grünlicher Farbe auf; ein konzentrierterer *Fröhde*sches Reagens bedingt bei gelindem Erwärmen alsbald einen Farbenwechsel von Grün in Kirschrot.

4. Reaktion von *Couerbe*. Bringt man zu einer Lösung des Narkotins in kalter konzentrierter Schwefelsäure nach 1 bis 2 Stunden eine Spur Salpetersäure, so färbt sie sich rot, und zwar wird die Färbung mit der Zeit schöner und intensiver.

Die gleiche Färbung erhält man mit dem *Erdmann*schen Reagens.

5. Reaktion von *A. Wangerin.*[1]) Werden auf einem Uhrschälchen 0·01 *g* Narkotin mit 20 Tropfen reiner konzentrierter Schwefelsäure und einem bis zwei Tropfen 1%iger Rohrzuckerlösung eine Minute lang unter Umrühren auf dem kochenden Wasserbade erhitzt, so geht die anfangs grünlichgelb gefärbte Lösung durch Gelb, Braungelb, Braun und Braunviolett in ein sehr schönes und intensives reines Blauviolett über. Die Intensität der Färbung nimmt beim Stehen noch etwas zu, und es hält sich der blauviolette Farbenton einige Stunden unverändert.

Hydrastin.

Hydrastin, $C_{21}H_{21}NO_6$, findet sich neben Berberin, $C_{20}H_{17}NO_4$, und Kanadin, $C_{20}H_{21}NO_4$, in der Hydrastinwurzel, der Wurzel von Hydrastin canadensis, in einer Menge von $1^1/_2$% und mehr vor. Das aus dieser Wurzel dargestellte und arzneilich angewandte Fluidextrakt enthält 2 bis $2^1/_2$% Hydrastin. Hydrastin kristallisiert aus Alkohol in rhombischen, bei 132° schmelzenden Prismen, ist fast unlöslich in Wasser, aber leicht löslich in heißem Alkohol, Benzol und Chloroform, schmeckt bitter und gibt alkalisch reagierende Lösungen. Die Hydrastinlösungen sind optisch aktiv: in Chloroform ist Hydrastin linksdrehend, während seine Lösung in verdünnter Salzsäure rechtsdrehend ist.

Hydrastin ist eine einsäurige Base, die sich durch ihr Verhalten gegen Jodalkyle als eine tertiäre Base zu erkennen gibt, z. B. mit Jodmethyl bildet es das in Nadeln kristallisierende Hydrastinmethyljodid, $C_{21}H_{21}NO_6 . CH_3J$. Durch Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure nach der Methode von *Zeisel* können ihm zwei Methylgruppen entzogen werden. Hydrastin enthält daher zwei Methoxylgruppen.

Nachweis des Hydrastins.

Hydrastin läßt sich der mit Natronlauge, Ammoniak oder Alkalikarbonat alkalisch gemachten Lösung mit Äther oder Chloroform entziehen. Aus dem Ätherauszuge der wässerig-alkalischen Flüssigkeit bleibt das Hydrastin im kristallinischen Zustande zurück. Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien fällt besonders Pikrinsäure die mit wenig Salzsäure oder Essigsäure bereiteten Hydrastinlösungen aus, ebenso die Pikrolonsäure. Zur Identifizierung des Hydrastins dienen die folgenden Reaktionen:

1. Kalte konzentrierte Schwefelsäure löst Hydrastin ohne Färbung auf; bei gelindem Erwärmen färben sich derartige Lösungen violett.

2. *Fröhdes* Reagens löst Hydrastin mit grüner, allmählich in Braun übergehende Farbe.

3. *Mandelins* Reagens löst Hydrastin mit rosenroter, allmählich in Orangerot übergehender Farbe, die mit der Zeit verblaßt.

[1]) *A. Wangerin*, Über Farbenreaktionen des Narceins und Narkotins. Pharm. Zeitung. 48. 607 (1903).

4. Löst man Hydrastin in verdünnter Schwefelsäure und fügt unter tüchtigem Umschütteln tropfenweise sehr verdünnte Kaliumpermanganatlösung hinzu, so fluoresziert das Gemisch durch entstandenes Hydrastinin schön blau.

Pilokarpin.

Pilokarpin, $C_{11}H_{16}N_2O_2$, findet sich neben Isopilokarpin und wahrscheinlich auch neben Pilokarpidin in den Jaborandiblättern, den Blättern von Pilocarpus pennatifolius.[1]) — Die freie Pilokarpinbase wird fast immer als eine halbflüssige, klebrige, nicht flüchtige Masse erhalten, die alkalisch reagiert, in Wasser nur wenig, in Alkohol, Äther und Chloroform leicht löslich und in Benzol unlöslich ist. Die Lösungen des Pilokarpins und seiner Salze sind rechtsdrehend. Als starke Base neutralisiert Pilokarpin die Säuren und bildet mit diesen meist kristallisierende Salze. Alkalilaugen scheiden aus den konzentrierten Salzlösungen die freie Pilokarpinbase ab, die sich aber im Überschuß des Fällungsmittels wieder löst. Durch Einwirkung von Natronlauge oder Natriumäthylat oder glatter bei einhalbstündigem Erhitzen von salzsaurem Pilokarpin auf 200° entsteht durch molekulare Umlagerung das mit Pilokarpin isomere, höchstwahrscheinlich stereoisomere Isopilokarpin, $C_{11}H_{16}N_2O_2$. Beide isomeren Pilokarpine unterscheiden sich im Schmelzpunkt, im Löslichkeitsverhalten und hauptsächlich auch im Drehungsvermögen. Isopilokarpin dreht schwächer nach rechts als Pilokarpin und kristallisiert in zerfließlichen, in Wasser und in Alkohol leicht löslichen Prismen. Auch die Salze der beiden Basen zeigen ähnliche Unterschiede.

Nitrat des Pilokarpins: $C_{11}H_{16}N_2O_2 . HNO_3$; Schmp. 178°; $[\alpha]_D = + 82{\cdot}90°$.
Nitrat des Isopilokarpins: $C_{11}H_{16}N_2O_2 . HNO_3$; Schmp. 159°; $[\alpha]_D = + 35{\cdot}68°$.

Nachweis des Pilokarpins.

Pilokarpin läßt sich aus der wässerigen, mit Natronlauge oder Alkalikarbonat alkalisch gemachten Flüssigkeit mit Äther, Chloroform oder Benzol ausschütteln und bleibt beim Eindunsten derartiger Lösungen als dicker, nicht kristallisierender, alkalisch reagierender Sirup oder Firnis zurück. — Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien zeichnen sich durch Empfindlichkeit für Pilokarpin aus: Jodjodkalium, Phosphormolybdänsäure, Phosphorwolframsäure und Wismutjodidjodkalium.

Spezielle Reaktionen des Pilokarpins.

Man gibt in ein Reagenzgläschen ein Körnchen Kaliumdichromat, gießt 1 bis 2 *cm*³ Chloroform darauf, dann Pilokarpin in Substanz oder Lösung sowie etwa 1 *cm*³ 3%iges Wasserstoffsuperoxyd und schüttelt ohne Unterbrechung einige Minuten um. Das anfangs gelbliche Reaktionsgemisch

---

[1]) Das Jaborin, das als ein weiteres eigentümliches Alkaloid der Jaborandiblätter beschrieben wurde, ist nach Untersuchungen von *H. A. D. Jowett* ein Gemisch von Isopilokarpin, Pilokarpidin, wenig Pilokarpin und Farbstoff.

wird allmählich dunkler und nach etwa 5 Minuten schwarzbraun. Das Chloroform erscheint dann, je nach der Menge des Pilokarpins, blauviolett dunkelblau oder indigoblau gefärbt, während die über der Chloroformschicht abstehende wässerige Flüssigkeit allmählich verblaßt. Mengen von 0·01 *g* Pilokarpin färben das Chloroform intensiv blau, solche von 0·001 *g* und weniger Pilokarpin mehr blauviolett. Die Färbung hält unter Umständen tagelang (*H. Helch*[1]).

Bemerkungen. Apomorphin, 0·01 *g*, färbt das Chloroform schon ohne Wasserstoffsuperoxyd blauviolett. — Strychnin gibt dem Chloroform einen kaum merkbaren Stich, verfärbt sich aber schon innerhalb weniger Minuten vollständig. — Antipyrin bringt nur beim Ansäuern des Wasserstoffsuperoxyds eine Färbung im Chloroform hervor.

2. *Mandelins* Reagens löst Pilokarpin mit goldgelber, allmählich hellgrün und schließlich hellbraun werdender Farbe.

3. Formalinschwefelsäure färbt sich beim Erwärmen mit Pilokarpin gelb, gelbbraun und blutrot.

Ob sich Pilokarpin noch in der Leiche nachweisen läßt, ist nicht bekannt, da Pilokarpinvergiftungen mit tödlichem Ausgange bis jetzt nicht vorgekommen sind.

Chinin.

Chinin, $C_{20}H_{24}N_2O_2$, fällt aus seinen Salzlösungen auf Zusatz von Alkalilaugen, Ammoniak oder Alkalikarbonat wasserfrei und stets amorph aus, um allmählich in den kristallinischen Zustand überzugehen und bildet dann ein Hydrat mit drei Mol. Kristallwasser. Auch andere Hydrate der freien Chininbase sind dargestellt. Das wasserfreie Chinin schmilzt bei 175°, das Trihydrat bei 57°. Beim Eindunsten seiner ätherischen Lösung bleibt Chinin in der Regel harz- oder firnisartig, nicht kristallinisch zurück. Chinin ist in etwa 2000 Teilen kaltem und 700 Teilen siedendem Wasser löslich und wird von Alkohol, Äther und Chloroform reichlich gelöst. Die mit Hilfe von Schwefelsäure, Essigsäure oder Weinsäure hergestellten Chininsalzlösungen fluoreszieren schön blau. Die mit Schwefelsäure bereitete Lösung zeigt noch eine deutlich wahrnehmbare Fluoreszenz bei einer Verdünnung von 1:100.000. Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure und Jodwasserstoffsäure rufen in Chininlösungen keine Fluoreszenz hervor; diese Säuren und ihre Salze heben sogar die Fluoreszenz auf, wenn sie einer fluoreszierenden Chininsalzlösung zugesetzt werden.

Chinin ist eine zweisäurige, bitertiäre Base, die mit 1 und 2 Äquivalenten Säure meist gut kristallisierende Salze bildet. Die beständigeren Chininsalze sind diejenigen mit 1 Äquivalent Säure. Das arzneilich angewandte salzsaure Chinin, Chininum hydrochloricum, $C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl \cdot 2H_2O$, kristallisiert in langen, zarten, büschelförmig vereinigten Nadeln. Die bitertiäre Natur des Chinins geht daraus hervor, daß es sich

[1]) *H. Helch*, Die Identitätsreaktionen des Pilocarpinum hydrochloricum. Pharmazeutische Post. 35, 289, 498 (1902) und 39, 373 (1906).

mit zwei Molekülen eines Alkyljodids additionell vereinigt, z. B. mit Methyljodid zum Chinindijodmethylat, $C_{20}H_{24}N_2O_2 . 2CH_3J$.

Nachweis des Chinins.

Chinin läßt sich einer wässerig-alkalischen Flüssigkeit mit Äther, Benzol oder Chloroform entziehen. Aus der ätherischen Lösung bleibt Chinin als harziger, nicht kristallisierender Firnis zurück, in welchem das Alkaloid durch die folgenden Reaktionen erkannt wird:

1. Verdünnte Schwefelsäure löst den Rückstand aus der Ätherlösung mit schön blauer Fluoreszenz, falls er Chinin enthält.

2. Thalleiochinprobe. Löst man den fraglichen Rückstand aus der Ätherlösung in wenig verdünnter Essigsäure und fügt 5 bis 10 Tropfen starkes Chlorwasser hinzu, so erhält man eine farblose, schwach blau fluoreszierende Lösung, die sich bei Gegenwart von Chinin mit überschüssigem Ammoniak schön grün färbt. Liegen größere Mengen Chinin vor, so erhält man einen grünen Niederschlag, das Thalleiochin. Dieses wird hierbei stets als eine amorphe Substanz wechselnder Zusammensetzung erhalten. Thalleiochin ist löslich in Alkohol und in Chloroform, aber unlöslich in Äther. *E. Polacci* erhitzt das Chinin, 0·01 *g*, mit wenig Bleisuperoxyd, mit 2—3 cm^3 Wasser und 2 Tröpfchen verdünnter Schwefelsäure ganz allmählich zum Sieden, läßt absitzen und schichtet dann über die klar abgegossene oder abfiltrierte Lösung vorsichtig 5—6 Tropfen Ammoniak; an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeitsschichten entsteht dann eine grün gefärbte Zone.

Nach *H. Fühner*[1]) ist die Thalleiochinreaktion an den p-Oxychinolinkomplex gebunden.

Verhinderung der Thalleiochinprobe. Antipyrin wirkt störend auf die Thalleiochinprobe. Gemische 1%iger Lösungen von Chinin und Antipyrin geben schließlich keine grüne, sondern eine sehr schöne rote Färbung. Die Wirkung des Antipyrins hört erst auf, wenn nur 0·25 Teile desselben auf 5 Teile Chinin kommen. — Auch Koffein verhindert das Zustandekommen der Thalleiochinprobe, wenn auf 2 Teile Chinin 3 Teile Koffein entfallen. Verschiedene andere Substanzen, unter diesen der Harnstoff, verhindern das Auftreten jedweder Färbung, während Atropin, Kokain, Kodein, Morphin, Pilokarpin, Strychnin, sowie Karbolsäure und Chloralhydrat einen störenden Einfluß auf die Thalleiochinprobe nicht ausüben.

3. Herapathitprobe. Man stelle sich eine Mischung her aus 30 Tropfen Essigsäure, 20 Tropfen absolutem Alkohol und 1 Tropfen verdünnter Schwefelsäure (20% H_2SO_4). — Wird 0·01 *g* Chinin mit 20 Tropfen dieser Mischung zum Sieden erhitzt, dann ein Tropfen einer alkoholischen Jodlösung (1 : 10) oder zwei Tröpfchen 1/10-n-Jodlösung hinzugesetzt, so scheiden sich alsbald, manchmal erst bei längerem Stehen, grüne, metallisch glänzende Kristallblättchen von sog. Herapathit aus. Der Herapathit hat die konstante Zusammensetzung ($4C_{20}H_{24}N_2O_2 . 3H_2SO_4 . 2HJ . 4J . 3H_2O$); er läßt sich aus siedendem Alkohol umkristallisieren.

---

[1]) *H. Fühner*, Zur Thalleiochinreaktion des Chinins und der Kynurensäurereaktion von *Jaffe*, Berichte d. Deutsch. chem. Ges. 38. 2713 (1905).

Im durchfallenden Lichte sind die Herapathitkriställchen blaß olivengrün, im reflektierten Lichte dagegen schön kanthäridengrün, metallisch glänzend.

Alkalilaugen, Ammoniak, schweflige Säure und Schwefelwasserstoff zersetzen den Herapathit. — Nach *A. Christensen* ist für die Herapathitprobe das folgende Reagens vorrätig zu halten: 1 Teil Jod + 1 Teil 50%ige Jodwasserstoffsäure + 0·8 Teile Schwefelsäure + 50 Teile 70%iger Alkohol. — Man versetze dann die auf Chinin zu prüfende alkoholische Lösung mit einigen Tropfen von diesem Reagens.

Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien empfiehlt sich besonders das Wismutjodid-Jodkalium als Fällungsmittel für Chinin: in schwefelsauren Chininlösungen entstehen mit diesem Reagens intensiv gelbrot gefärbte Niederschläge, welche beim Schütteln mit Natronlauge, Ausziehen mit Äther und Verdunstenlassen der ätherischen Lösung das Chinin unverändert liefern. *H. Thoms*[1]) verwendet diese Reaktion zur quantitativen Abscheidung des Chinins aus Gemischen.

Koffein.

Koffein. Da Koffein eine schwache Base ist, geht ein freilich nur kleiner Teil aus der wässerig-weinsauren Lösung in Äther über; bei weitem die größere Menge von vorhandenem Koffein läßt sich aus wässerig-alkalischer Flüssigkeit mit Äther, besser Chloroform, ausschütteln; beim Eindunsten des Ätherauszuges bleibt Koffein in weißen, stark glänzenden, meist strahlig gruppierten Nädelchen zurück. Da Koffein in Äther ziemlich schwer löslich ist, schüttelt man die wässerig-alkalische Flüssigkeit mit größeren Mengen aus. Über den Nachweis des Koffeins vergl. die früheren Angaben.

Antipyrin.

Antipyrin. Die größte Menge des Antipyrins geht aus der wässerig-alkalischen Flüssigkeit in Äther über; dieser Ätherauszug liefert meist ein reineres Antipyrin, häufig sogar Kristallblättchen, als derjenige der weinsauren Lösung. Antipyrin unterscheidet sich von den meisten Alkaloiden dadurch, daß es nur schwach bitter schmeckt und in Wasser sehr leicht löslich ist. Zum Nachweise des Antipyrins löst man einen erhaltenen Verdunstungsrückstand aus der ätherischen Lösung in wenig Wasser und prüft die abfiltrierte Lösung, auf zwei Probierröhrchen verteilt, mit Eisenchloridlösung und mit rauchender Salpetersäure auf Antipyrin. (Vergl. die früheren Angaben über Antipyrin.)

Nachweis des Antipyrins im Harn. Nach innerlicher Darreichung von Antipyrin ist der Harn intensiv gelb bis blutrot gefärbt. Antipyrin geht im tierischen Organismus zum Teil als Oxyantipyringlukuronsäure, zum Teil unverändert in den Harn über und kann meist im Harn direkt mit Eisenchloridlösung nachgewiesen werden. Zum sicheren

[1]) *D. Jonescu* und *H. Thoms*, Über die Fällbarkeit und quantitative Bestimmung von Alkaloiden mit Hilfe von Kaliumwismutjodidlösung. Berichte d. Deutsch. pharmaz. Ges. **16**, 130 (1906).

Nachweis des Antipyrins versetzt man eine größere Menge des fraglichen Harns mit Ammoniak im Überschusse, schüttelt mit Chloroform aus, dunstet den abfiltrierten Chloroformauszug ein, löst den bleibenden Rückstand in wenig Wasser auf und prüft die abfiltrierte Lösung mit Eisenchloridlösung und mit rauchender Salpetersäure auf Antipyrin.

Antipyrin wird leicht resorbiert: schon eine Stunde nach Einnahme von Antipyrin kann der Harn eine rötliche Farbe zeigen und die Eisenchloridreaktion geben. Die rote Farbe ist nach 24 Stunden verschwunden, die Antipyrinausscheidung dauert aber noch fort und es kann Antipyrin selbst noch nach 36 Stunden nachgewiesen werden. Zweckmäßig überschichtet man den Harn mit einer stark verdünnten Eisenchloridlösung: ist der Harn antipyrinhaltig, so bildet sich ein roter Ring. — Nach *Jonescu*[1]) geht beim Menschen innerlich eingenommenes Antipyrin unverändert als solches in den Harn über: nur zum geringen Teil, nämlich nach großen Dosen, wird es, an Schwefelsäure gebunden, ausgeschieden. Eine Paarung mit Glukuronsäure tritt nach *Jonescu* im menschlichen Organismus nicht ein.

Pyramidon.

Pyramidon oder 4-Dimethylaminoantipyrin, $C_{12}H_{17}N_2O$, wird in neuerer Zeit als fieber- und schmerzstillendes Arzneimittel vielfach gebraucht: es bildet ein fast geschmackloses, weißes, in Wasser leicht lösliches, kristallinisches, bei 108° schmelzendes Pulver. Die wässerige Lösung desselben reagiert neutral; aus weinsaurer Lösung geht es nur in Spuren in Äther über, läßt sich aber aus der wässerig-alkalischen Lösung mittelst Äther oder Chloroform leicht und vollständig ausschütteln und bleibt dann beim Eindunsten des Lösungsmittels meist in feinen Nädelchen zurück. Pyramidon ist in Alkohol, Äther, Chloroform und Benzol leicht löslich. Es unterscheidet sich vom Antipyrin durch sein kräftiges Reduktionsvermögen, z. B. reduziert es Goldchlorid schon in der Kälte, während Antipyrin und Tolypyrin mit Goldchlorid erst beim Kochen reagieren.

Reaktionen des Pyramidons.

1. Mit Eisenchloridlösung gibt Pyramidon eine blauviolette, bald ins Rotviolett übergehende und darauf verschwindende Färbung.

2. Eine wässerige Pyramidonlösung färbt sich mit einigen Tropfen rauchender Salpetersäure blau bis blauviolett.

3. Bromwasser bewirkt eine graue, in konzentrierten Pyramidonlösungen eine tintenartige Verfärbung.

4. Jodtinktur färbt eine wässerige Pyramidonlösung blau.

C. Die Untersuchung des Ätherauszuges und des Chloroformauszuges der mit Ammoniak alkalisch gemachten wässerigen Flüssigkeit.

[1]) *D. Jonescu*, Über die Antipyrinausscheidung aus dem menschlichen Organismus. Berichte d. Deutsch. pharmaz. Ges. **16**. 133 (1906).

α) Ätherauszug: Apomorphin und Spuren von Morphin.[1]

β) Chloroformauszug: Morphin und Narcein.

Auch Antipyrin, Colchicin und Koffein[2] können sich in diesem Auszuge noch vorfinden.

Die von Äther getrennte, wässerige, alkalisch reagierende Flüssigkeit muß noch auf die unter α und β angeführten Stoffe geprüft werden. Apomorphin gibt sich schon dadurch zu erkennen, daß die ursprüngliche, wässerige, weinsaure Lösung des Untersuchungsmaterials schön grün gefärbt ist und daß sie sich beim Übersättigen mit Natronlauge, besonders beim Stehen an der Luft, infolge eintretender Oxydation allmählich purpurrot färbt; ferner sind die Ätherauszüge der wässerig-weinsauren und der wässerig-alkalischen Flüssigkeit bei Vorhandensein von Apomorphin rot oder violettrot gefärbt. Zeigen die nach dem *Stas-Otto*schen Verfahren enthaltenen wässerigen und ätherischen Lösungen die angegebenen Eigenschaften nicht, so braucht man nicht auf Apomorphin zu untersuchen, also auch nicht mit Äther auszuschütteln; man geht dann direkt zur Untersuchung auf Morphin und Narcein über.

Um Apomorphin, Morphin und Narcein mit einem geeigneten Lösungsmittel ausziehen zu können, muß die vom Äther getrennte, wässerige, durch Natron alkalisch reagierende Flüssigkeit erst mit Ammoniak alkalisch gemacht werden. Dies geschieht in der Weise, daß die betreffende Flüssigkeit erst mit verdünnter Salzsäure angesäuert (Probe mit blauem Lackmuspapier), dann mit Ammoniakflüssigkeit bis zur alkalischen Reaktion versetzt wird.

α) Kann nach dem oben angegebenen Verhalten Apomorphin vorhanden sein, so schüttelt man die in der angegebenen Weise mit Ammoniak alkalisch gemachte, wässerige Flüssigkeit sofort wiederholt mit Äther und alsdann, nämlich zur Prüfung auf Morphin und Narcein, wiederholt mit heißem Chloroform aus.

β) Kann aber Apomorphin nicht vorhanden sein (oder hat man auf dasselbe bei einer Untersuchung keine Rücksicht zu nehmen), so schüttelt man die „ammoniakalische" Flüssigkeit direkt, und zwar wiederholt mit heißem Chloroform aus (siehe weiter unten).

Apomorphin.

Apomorphin, $C_{17}H_{17}NO_2$, ist eine in Alkohol, Äther, Benzol und Chloroform leicht lösliche, amorphe Base, die sich an der Luft schön grün färbt; auch die wässerigen und alkoholischen Lösungen des Apomorphins, die ursprünglich farblos sind, färben sich an der Luft infolge von Oxydation bald grünlich. Die Lösungen des durch Oxydation veränderten Apomor-

[1] Das frisch gefällte, noch amorphe Morphin geht in Spuren in Äther über.

[2] Antipyrin, Colchicin und Koffein sind in Äther schwer, in Chloroform aber leicht löslich; sind diese Stoffe aus der wässerig-alkalischen Flüssigkeit mit Äther nicht vollständig ausgeschüttelt worden, wie dies häufig vorkommt, so finden sie sich auch noch im Chloroformauszuge neben Morphin und Narceïn vor.

phins in Wasser und Weingeist sind smaragdgrün, die in Äther und Benzol purpurviolett und die in Chloroform blauviolett gefärbt. Apomorphin löst sich wie Morphin in Kali- und Natronlauge, besitzt also Phenolcharakter. Die alkalischen Lösungen des Alkaloids bräunen sich alsbald oder färben sich an der Luft unter Sauerstoffaufnahme sogar schwarz. Vom Morphin unterscheidet sich Apomorphin durch eine größere Löslichkeit in Wasser und in Weingeist, besonders aber durch seine Löslichkeit in Äther, Benzol und kaltem Chloroform, worin Morphin fast unlöslich ist.

α) Ätherauszug: Nachweis des Apomorphins.

Aus weinsaurer Lösung läßt sich Apomorphin mit Äther nicht ausschütteln; es gehen aber seine farbigen Oxydationsprodukte in diesen über. Die Lösung des Alkaloids in Kalilauge oder Natronlauge verhält sich geradeso; nur einer mit Ammoniak alkalisch gemachten Flüssigkeit läßt sich Apomorphin mit Äther oder Chloroform entziehen. Seine ätherische Lösung hinterläßt das Apomorphin beim Eindunsten als einen meist grünlich gefärbten Rückstand, der stark reduzierend wirkt; beispielsweise wird Jodsäure reduziert unter Freiwerden von Jod, Goldchlorid unter Purpurfärbung. Apomorphin wird durch die folgenden Reaktionen erkannt:

1. Konzentrierte Schwefelsäure löst Apomorphin ohne Färbung auf; fügt man zu dieser Lösung ein Tröpfchen konzentrierte Salpetersäure, so nimmt sie vorübergehend eine violette Färbung an, die alsbald in Blutrot und schließlich in Gelbrot übergeht. Konzentrierte Salpetersäure allein gibt mit Apomorphin violettrot gefärbte, alsbald rotbraun und schließlich braunrot werdende Lösungen.

2. *Pellagri*sche Reaktion. Versetzt man eine Lösung von Apomorphin in verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure erst mit überschüssigem Natriumbikarbonat, dann tropfenweise mit 1—3 Tröpfchen alkoholischer Jodlösung und schüttelt tüchtig durch, so färbt sie sich blaugrün oder mehr smaragdgrün; schüttelt man hierauf mit wenig Äther aus, so färbt sich dieser schön violettrot, während die wässerige Flüssigkeit noch grün gefärbt bleibt.

3. *Fröhdes* Reagens löst reines Apomorphin mit grüner, die durch die Luft mehr oder weniger veränderte Base mit violetter Farbe.

4. *A. Wangerinsche* Reaktion.[1]) Versetzt man 1 cm^3 einer frisch bereiteten, etwa $1^0/_0$igen Kaliumbichromatlösung und schüttelt etwa eine Minute lang, so färbt sich die Lösung tief dunkelgrün. Schüttelt man alsdann mit einigen Kubikzentimetern Essigäther kräftig durch, so färbt sich dieser bleibend schön violett. Gibt man jetzt etwa 5 Tropfen einer $1^0/_0$igen Zinnchlorürlösung[2]) hinzu und schüttelt einmal um, so tritt ein

[1]) *A. Wangerin*, Über den *Helch*schen Pilokarpinnachweis und über Apomorphinreaktionen. Pharmazeutische Zeitung. 47, 599 und 739/40 (1902).

[2]) Diese Zinnchlorürlösung wird hergestellt aus 1 *g* $SnCl_2 . 2H_2O$ 50 cm^3 Salzsäure von 25% HCl und 50 cm^3 Wasser.

Farbenumschlag der Essigätherschicht in Grün ein und durch erneuten Zusatz einiger Tropfen der Kaliumdichromatlösung wird der Essigäther wieder violett gefärbt. Nimmt man beim Anstellen dieser Probe statt des Essigäthers 10 *cm*³ Chloroform, so färbt sich das letztere durch das Oxydationsprodukt des Apomorphins ebenfalls violett, aber bei nachherigem vorsichtigen Zusatz der Zinnchlorürlösung rein indigoblau; bei Schütteln mit einer weiteren Menge Kaliumdichromatlösung bleibt aber diese Blaufärbung bestehen.

Die Untersuchung des Chloroformauszuges.

Vorprobe auf Morphin. Zur vorläufigen Prüfung auf Morphin säuert man eine Probe der vom Äther getrennten, wässerig-alkalischen Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure an, setzt einige Tropfen Jodsäurelösung hinzu und schüttelt mit wenig Chloroform aus; färbt sich das letztere durch freies Jod violett, so kann Morphin zugegen sein. Der positive Ausfall dieser Probe gestattet aber keinen bestimmten Schluß auf das Vorhandensein von Morphin, da es außer diesem Alkaloid noch sehr viele organische Stoffe gibt, die ebenfalls Jodsäure reduzieren.[1] Die Jodsäurereaktion hat demnach nur den Wert einer empfindlichen Vorprobe auf Morphin: tritt die Reaktion nicht ein, so ist höchst wahrscheinlich Morphin nicht vorhanden; tritt sie aber ein, so kann Morphin zugegen sein.

Zum sicheren Nachweis des Morphins und Narceins schüttelt man die nach den obigen Angaben mit Ammoniak alkalisch gemachte wässerige Flüssigkeit in einer geräumigen Kochflasche sofort mit ziemlich viel heißem Chloroform[2] aus und trennt die beiden Flüssigkeitsschichten in einem Scheidetrichter. Ein wiederholtes Ausschütteln der wässerigen Flüssigkeit mit neuen Mengen von heißem Chloroform ist unbedingt notwendig, weil die freie Morphinbase auch in siedendem Chloroform nur wenig löslich ist. Sollte das Chloroform mit der wässerigen Flüssigkeit eine sich nur schwer trennende Emulsion geben, so fügt man einige Tropfen Alkohol hinzu, stellt die Kochflasche mit diesem Gemisch auf das warme, nicht kochende Wasserbad und schwenkt sie von Zeit zu Zeit vorsichtig um. Hierbei trennt sich die Chloroformschicht meist alsbald von der wässerigen Flüssigkeit. Die sämtlichen Chloroformauszüge bringt man in eine trockene Kochflasche, fügt zur Beseitigung von etwa anhaftendem Wasser einige Kriställchen trockenes Kochsalz oder entwässertes Natriumsulfat hinzu, gießt die völlig klar gewordene Chloroformlösung durch ein trockenes Filter und läßt sie auf einer nicht zu großen Uhrschale, die man

[1] Bei der Untersuchung von Leichenteilen, die absolut morphinfrei befunden wurden, hat der Verfasser wiederholt Auszüge erhalten, die Jodsäure stark reduzierten.

[2] *C. Kippenberger*, Beiträge zur analytischen Chemie der Alkaloide, Zeitschr. f. analyt. Chem. **39**. 201. 290 (1900) nimmt zum Ausschütteln des Morphins ein Chloroform, das 10 Vol.-Proz. absoluten Alkohol enthält.

auf das erwärmte Wasserbad stellt, eindunsten; man filtriert die Chloroformlösung direkt auf die Uhrschale in dem Maße, wie das Chloroform verdampft. Bleibt hierbei ein bitter schmeckender Verdunstungsrückstand, der mit Hilfe eines Platinspatels oder eines Taschenmessers zusammenzukratzen ist, so ist er auf Morphin und Narcein[1]) zu untersuchen. Man untersucht diesen Verdunstungsrückstand mit Hilfe der *Fröhde*schen, *Husemann*schen und *Pellagri*schen Probe, wie auch mit Formalinschwefelsäure auf Morphin. Nur wenn alle diese Morphinproben zu einem positiven Ergebnisse führen, ist Morphin nachgewiesen! Falls es die Menge des erhaltenen Chloroformrückstandes gestattet, sucht man das Morphin auch mit Eisenchloridlösung nachzuweisen, denn gerade diese Probe ist für Morphin äußerst charakteristisch, erfordert aber freilich mehr als Spuren von Morphin.

Die Reinigung des erhaltenen Rohmorphins.

Ist der erhaltene Verdunstungsrückstand der Chloroformauszüge zu sehr verunreinigt und besonders durch Farbstoff rötlich oder bräunlich gefärbt, so ist eine Reinigung des Rückstandes notwendig. Man löst dann den Rückstand in heißem Amylalkohol auf und schüttelt diese Lösung mit heißem Wasser, das einige Tropfen verdünnte Schwefelsäure enthält, wiederholt tüchtig aus. Die Säure entzieht hierbei dem Amylalkohol das Morphin, während die färbenden Stoffe im Amylalkohol größtenteils gelöst bleiben. Man versetzt dann die in einem Scheidetrichter abgetrennte wässerige, schwefelsaure Lösung mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion und schüttelt sie wiederholt tüchtig mit heißem Chloroform aus. Dieser Chloroformauszug läßt beim Eindunsten etwa vorhandenes Morphin meist im nahezu reinen Zustande zurück.

Morphin.

Morphin, $C_{17}H_{19}NO_3$, kristallisiert aus verdünntem Alkohol in farblosen durchscheinenden, glänzenden Prismen, die in Wasser nur wenig löslich sind, 1 : 5000 bei 15° und 1 : 500 bei 100° und die stark bitter schmeckende, alkalisch reagierende Lösungen geben. In Äther und Benzol ist das kristallisierte Morphin unlöslich. Von Amylalkohol, heißem Chloroform und Essigäther wird das amorphe Alkaloid gelöst. Aus den Morphinsalzlösungen wird durch Ammoniak, Kalilauge, Natronlauge und Alkalikarbonat die freie Morphinbase gefällt, die aber als phenolartige Verbindung im Überschusse der Alkalilauge löslich ist.

Morphin ist eine einsäurige und zwar tertiäre Base, die mit einem Äquivalent Säure meist gut kristallisierende Salze gibt.

Morphin wird leicht oxydiert, in alkalischer Lösung schon durch den Luftsauerstoff, ferner durch Kaliumpermanganat, Ferricyankalium,

[1]) Auch Antipyrin, Colchicin und Koffein können sich in diesem Rückstande vorfinden (s. oben).

ammoniakalische Kupferlösung, indem hierbei das ungiftige, in Alkalilauge lösliche Oxydimorphin entsteht, das auch Pseudomorphin genannt wird:

$$2\,C_{17}H_{19}NO_3 + O = (C_{17}H_{18}NO_3)_2 + H_2O.$$

Morphin Oxydimorphin.

Infolge der leichten Oxydierbarkeit wirkt Morphin stark reduzierend.

Nachweis des Morphins.

1. Konzentrierte Salpetersäure löst Morphin mit blutroter, allmählich in Gelb übergehender Farbe. Zinnchlorür oder Schwefelammonium rufen in dieser gelb gewordenen Lösung keine Violettfärbung hervor (Unterschied von Brucin).

2. *Husemann*sche Reaktion. Konzentrierte Schwefelsäure löst Morphin ohne Färbung auf. Erhitzt man eine derartige Morphinlösung in einem Uhrschälchen ½ Stunde lang auf dem Wasserbade oder ganz kurze Zeit über einer kleinen Flamme, und zwar so lange, bis reichlich weiße Dämpfe auftreten, so färbt sich die Lösung rötlich oder bräunlich. Fügt man dann zu der vollständig erkalteten Lösung einen Tropfen konzentrierte Salpetersäure hinzu, so tritt ganz vorübergehend eine rotviolette Färbung auf, die alsbald in Blutrot oder Gelbrot übergeht, um schließlich ganz zu verblassen.

Diese Reaktion gelingt auch in der Weise recht gut, daß man die Lösung des Morphins in der konzentrierten Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur 24 Stunden lang im Exsikkator stehen läßt und dann eine Spur konzentrierte Salpetersäure zusetzt.

Statt der Salpetersäure können auch einige Körnchen Salpeter oder chlorsaures Kalium verwendet werden.

Ist das Morphin nicht vollkommen rein, also in einem Zustande, wie es gewöhnlich bei der Untersuchung von Leichenteilen aus der Chloroformlösung zurückbleibt, so gibt es mit Schwefelsäure meist eine stark gefärbte Lösung, die sich beim Erwärmen noch dunkler färbt. Aber auch dann ist die Rotfärbung noch deutlich zu erkennen, wenn die erkaltete schwefelsaure Lösung mit Salpetersäure oder Salpeter versetzt wird.

3. *Pellagri*sche Reaktion wird in der für Kodein angegebenen Weise ausgeführt; ein Überschuß an alkoholischer Jodlösung muß vermieden werden, weil sonst die grüne Färbung durch die des Jods verdeckt wird.

4. „*Fröhde*" löst Morphin mit schön violetter Farbe, die durch Blau in ein schmutziges Grün und schließlich in ein schwaches Rot übergeht. Auf Zusatz von Wasser verschwinden diese Färbungen.

5. *Marquis*' Reagens. Formalinschwefelsäure[1]) löst Morphin mit purpurroter Farbe auf, die in Violett und schließlich in ein reines Blau übergeht. Bringt man die blau gewordene Lösung in ein engeres

[1]) Man mische 2—3 Tropfen 40%ige Formaldehydlösung = Formaldehydum solutum des „Arzneibuches" mit 5 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und verwende für die Morphinprobe einige Tropfen dieser erkalteten Mischung.

Reagenzgläschen, so daß die Luft nur ungenügend Zutritt hat, so hält sich der blaue Farbenton längere Zeit. Außer Morphin geben auch Codein und Apomorphin mit Formalinschwefelsäure die violette Farbenreaktion. Auch Narkotin gibt violett gefärbte Lösungen; doch geht die Farbe in Olivgrün und schließlich in Gelb über. Oxydimorphin färbt sich mit dem *Marquis*schen Reagens grün.

6. Jodsäureprobe. Schüttelt man eine Lösung von Morphin in verdünnter Schwefelsäure mit einigen Tropfen einer wässerigen Lösung von reiner Jodsäure und mit wenig Chloroform, so färbt sich letzteres durch freies Jod violett.

Diese empfindliche Probe ist selbstverständlich nur dann für Morphin beweisend, wenn andere reduzierend wirkende Substanzen nicht zugegen sind.

7. Eisenchloridprobe. Eine neutrale Morphinsalzlösung färbt sich mit neutraler Eisenchloridlösung rein blau. Den Verdunstungsrückstand aus der Chloroformlösung löse man in wenig stark verdünnter Salzsäure auf, dunste die Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne ein und versetze die wässerige Lösung des Rückstandes mit 1—2 Tröpfchen Eisenchloridlösung. Durch diese Probe gibt sich das Morphin als Phenol zu erkennen.

8. *Lloyd*sche Reaktion. Die Violettfärbung, die eine schwefelsaure Strychninlösung mit Kaliumdichromat gibt, wird nach *Lloyd* auch durch ein Gemisch von Morphin, Hydrastin und konzentrierter Schwefelsäure allein, also ohne Dichromat, hervorgerufen. Zum Nachweis des Morphins bzw. Hydrastins läßt sich die *Lloyd*sche Reaktion nur dann verwerten, wenn mehr als Spuren der beiden Alkaloide vorhanden sind. Als charakteristisch können nach *A. Wangerin*[1] nur diejenigen Reaktionen gelten, bei denen 0·005—0·01 *g* Morphin und 0·002—0·01 *g* Hydrastin zur Einwirkung kommen. Ungefähr diese Mengen der beiden Alkaloide zerreibt man zunächst für sich im Uhrschälchen möglichst innig, fügt 5 Tropfen reine konzentrierte Schwefelsäure hinzu und durchrührt das Gemisch bei weißer Unterlage 10 Minuten lang. Der Farbenton des Gemisches ist dann im Innern klar rotviolett und in den dünneren äußeren Schichten mehr oder minder blauviolett.

Salzsaures Apomorphin gibt beim Verreiben mit Hydrastin und konzentrierter Schwefelsäure fast die gleiche Reaktion wie Morphin.

9. Ferricyankaliumprobe. Die wässerige Lösung eines Morphinsalzes färbt sich, mit einigen Tropfen einer stark verdünnten Mischung von Ferricyankalium- und Eisenchloridlösung versetzt, tief blau, oder es scheidet sich, falls größere Mengen von Morphin vorliegen, ein blauer Niederschlag ab.

10. Erwärmt man eine wässerige Morphinsalzlösung mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung, so fällt graues metallisches Silber aus.

---

[1] *A. Wangerin*, Beitrag zur *Lloyd*schen Reaktion auf Morphium. Pharmazeutische Zeitnug. 48. 57 (1903).

Allgemeine Alkaloidreagenzien. Von diesen zeichnen sich durch größere Empfindlichkeit gegen Morphinsalzlösungen aus: Jodjodkalium, Phosphorwolframsäure, Quecksilberjodidjodkalium, Wismutjodidjodkalium, Phosphormolybdänsäure und Goldchlorid. Platinchlorid erzeugt erst nach einiger Zeit einen orangegelben, körnigen Niederschlag. — Gerbsäurelösung bewirkt entweder keine Fällung oder höchstens eine sehr schwache, nach einiger Zeit etwas stärker werdende Trübung.

Verhalten des Morphins im tierischen Organismus.

Morphin wird ebenso von der Schleimhaut des Magens als von der des Mastdarms und der Luftwege als auch von offenen Wunden aus resorbiert. Unter die Haut gespritzt, wirkt Morphin schneller und stärker als vom Magen aus. Aus dem Blute verschwindet Morphin nach *Marquis*[1]) sehr rasch, indem es an gewisse Organe, wie an das Gehirn, gebunden oder, wie man auch sagt, verankert wird. Ein Teil des resorbierten Morphins wird mit Glukuronsäure gepaart, ein Teil wird oxydiert, während der Rest des Alkaloids unverändert als solches ausgeschieden wird. Nach *Faust* wird Morphin nur bei den Menschen und Tieren, die an das Gift gewöhnt sind, umgewandelt bzw. zerstört, während bei nicht Immunisierten das Morphin unverändert durch den Kot, und zwar nahezu quantitativ ausgeschieden werden soll. Im Harn erscheint Morphin bei medizinalen Dosen nur in sehr geringer Menge. Ein nicht geringer Teil des aufgenommenen Morphins wird bei Menschen und Hunden durch die Drüsen des Magendarmkanals wieder ausgeschieden, selbst wenn das Alkaloid subkutan eingespritzt wurde.

Bei intravenös eingespritztem Morphin werden nach *Marquis* schon im Verlaufe von 15 Minuten über 30% in der Leber abgelagert, und dieses Morphin ist darin zunächst noch frei vorhanden, wird aber alsbald gebunden oder umgewandelt. Im Gehirn beginnt die Bindung des Morphins ebenfalls sehr bald. Auch im Blute, in der Milz, in den Nieren und in der Darmschleimhaut wird das freie Morphin rasch verändert. In allen Fällen wird nach *Marquis* bei akuter und noch mehr bei chronischer Morphinvergiftung ein erheblicher Teil des Giftes aus dem Blute entfernt und in Speicheldrüsen, Magenschleimhaut, Dickdarmschleimhaut, Niere, Milz, Leber aufgestapelt und dadurch dem Gehirn und Rückenmark entzogen.

Gegen Leichenfäulnis ist Morphin ziemlich beständig. So konnte *W. Autenrieth*[2]) das Morphin von morphinhaltigen Leichenteilen, nämlich in Magen und Darm samt Inhalt, die in einem Glasgefäße bei ungenügendem Luftzutritt vollständig in Verwesung übergegangen waren, noch nach 15 Monaten nachweisen.

---

[1]) Arbeiten des Dorpater Instituts ed. *Kobert*. 14 (1896).

[2]) *W. Autenrieth*, Über das Verhalten des Morphins und Strychnins bei der Leichenfäulnis. Berichte d. Deutsch. pharmazeut. Gesellsch. **11**. 494 (1901).

Narcein.

Narcein, $C_{23}H_{27}NO_8 . 3H_2O$, kristallisiert aus Wasser oder Alkohol in Prismen, die lufttrocken bei 165° schmelzen, schwach bitter schmecken, in kaltem Wasser nur wenig, in siedendem Wasser aber reichlich löslich sind. Die heiß gesättigte, wässerige Narceinlösung erstarrt beim Erkalten zu einem Kristallbrei. In Äther, Benzol und Petroläther ist Narcein unlöslich und wird auch von kaltem Alkohol, Amylalkohol und Chloroform nur schwer gelöst. — Für die Auffindung des Narceins ist es wichtig, zu wissen, daß es aus einer mit Kalilauge oder Natronlauge alkalisch gemachten Lösung durch Äther, Benzol oder Petroläther nicht aufgenommen wird, wohl aber kann es einer mit Ammoniak alkalisch gemachten, wässerigen Flüssigkeit durch heißes Chloroform sowie heißen Amylalkohol entzogen werden.

Narcein ist eine schwache, tertiäre Base mit zwei an Stickstoff gebundenen Methylgruppen.

Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien zeichnen sich Jodjodkalium, Quecksilberjodidjodkalium, Wismutjodidjodkalium und Phosphormolybdänsäure durch eine größere Empfindlichkeit für Narcein aus.

Nachweis des Narceins.

1. Konzentrierte Schwefelsäure löst Narcein mit graubrauner Farbe auf, die bei längerem Stehen in der Kälte allmählich, beim Erwärmen sofort, in Blutrot übergeht.

2. Erwärmt man Narcein in einem Porzellanschälchen mit verdünnter Schwefelsäure auf dem Wasserbade, so nimmt die Säure bei einer bestimmten Konzentration eine schön violette Färbung an, die bei längerem Erhitzen in Kirschrot übergeht.

3. *Fröhde* löst Narcein mit braungrüner Farbe, die allmählich in Grün und schließlich in Rot übergeht; gelindes Erwärmen beschleunigt diesen Farbenwechsel.

4. Jodwasser sowie Joddampf färben festes Narcein blau. — Morphin verhindert diese Reaktion gänzlich oder beeinträchtigt sie stark.

5. *Erdmanns* Reagens sowie konzentrierte Salpetersäure lösen Narcein mit gelber, beim Erwärmen in Dunkelorange übergehender Farbe.

6. Resorcin-Schwefelsäure. Verreibt man 0·01—0·02 *g* Resorcin mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure, fügt eine Spur Narcein, 0·002—0·005 *g*, hinzu und erwärmt diese intensiv gelb gefärbte Lösung unter Umrühren auf dem kochenden Wasserbade, so färbt sie sich prächtig karmoisinrot bis kirschrot. Diese Färbung geht nach dem Erkalten allmählich vom Rande aus durch Blutrot nach mehreren Stunden in Orangegelb über.

7. Tannin-Schwefelsäure. Erhitzt man 0·002—0·01 *g* Narcein mit 0·01—0·02 *g* Tannin und 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf dem Wasserbade unter Umrühren, so färbt sich die erst gelbbraune Lösung alsbald rein grün. Bei länger dauerndem Erhitzen auf dem Wasserbade geht die grüne Färbung in Blaugrün und schließlich durch einen mehr oder minder blauen Farbenton in ein schmutziges Grün über.

Eine ähnliche grüne Farbenreaktion mit Tanninschwefelsäure geben auch Narkotin und Hydrastin, die ja ihrer chemischen Konstitution nach dem Narcein verwandt sind.

Verhalten der wichtigeren Alkaloide gegen konzentrierte Salpetersäure, konzentrierte Schwefelsäure, Fröhdes Reagens, Mandelins Reagens, Meckes Reagens und Marquis' Reagens.

Verschiedene der wichtigeren Alkaloide geben mit den in der Überschrift verzeichneten Reagenzien Färbungen, die für die betreffenden Alkaloide mehr oder weniger charakteristisch sind.

Reine konzentrierte Salpetersäure von 1·40 spez. Gew. löst:

Berberin rotbraun,
Brucin blutrot, alsbald gelb,
Codein gelb bis orangefarben,
Colchicin violett, bald schmutzig grünlichbraun,
Morphin rotgelb,
Narcein vorübergehend gelb,
Narkotin zitronengelb,
Papaverin gelb, dann orangefarben,
Physostigmin gelb,
Strychnin gelb,
Thebain gelb,
Veratrin schwach gelblich.

Von anderen bekannten Alkaloiden werden Akonitin, Atropin, Coffein, Chinin, Cinchonin, Cocain, Coniin, Cytisin, Nikotin und Theobromin von konzentrierter Salpetersäure von 1·40 spez. Gew. ohne Färbung gelöst.

Reine konzentrierte Schwefelsäure löst:

Berberin olivengrün, dann gelb,
Colchicin gelb,
Curarin rot,
Digitalin orangegelb und rot,
Emetin blaßbräunlich,
Narcein gelb, bald braungelb,
Narkotin blaßgelb, allmählich gelbrot,
Papaverin violettblau,
Physostigmin gelb, bald grün,
Pikrotoxin orangegelb,
Solanin rötlich gelb,
Thebain blutrot, später gelbrot,
Veratrin gelb mit grüner Fluoreszenz, dann orangefarben und kirschrot.

Reine konzentrierte Schwefelsäure löst die folgenden Alkaloide, falls nicht erwärmt wird, ohne Färbung auf: Atropin, Brucin, Chinin, Cinchonin, Cocain, Coffein, Codein, Cytisin, Hydrastin, Morphin, Nikotin, Pilokarpin, Strychnin und Theobromin.

Fröhdes Reagens oder Molybdänschwefelsäure[1]) löst:

Berberin braungrün,
Brucin himbeerrot, bräunlichgelb,
Codein grünlich, beim Erwärmen blau,
Colchicin gelb,
Curarin violett,
Morphin violettrot, dann grün,
Narcein gelbbraun,
Narkotin blaugrün, grün, rötlichgelb,
Papaverin violettblau, dann gelb,
Solanin gelbrot, rotbraun, gelb,
Thebain rot, rotgelb,
Veratrin gelb, orange, kirschrot.

Keine Färbungen mit *Fröhdes* Reagens geben: Atropin, Chinin, Cinchonin, Cocain, Coffein, Cytisin, Nikotin, Strychnin und Theobromin.

Mandelins Reagens oder Vanadinschwefelsäure löst:

Berberin schmutziggrün, später braun,
Brucin rot, gelb,
Codein grün, beim Erwärmen blau,
Colchicin blaugrün, grün, braun,
Curarin violett,
Emetin braun,
Morphin rot, dann blauviolett,
Narkotin zinnoberrot bis karminrot,
Narcein violett, später rotgelb,
Papaverin blaugrün, dann blau,
Pikrotoxin gelbrot,
Solanin orangerot, später violett,
Strychnin blauviolett,
Thebain orangerot,
Veratrin gelb, kirschrot.

Keine Färbungen mit *Mandelins* Reagens geben: Atropin, Chinin, Cinchonin, Cocain, Coffein, Coniin, Cytisin, Nikotin und Theobromin.

Meckes Reagens[2]) oder Selenigsäure—Schwefelsäure löst:

	In der Kälte:	Beim Erwärmen:
Apomorphin . . .	dunkelblauviolett,	dunkelbraun,
Brucin	gelbrot,	zitronengelb,
Codein	blau, rasch smaragdgrün, später olivengrün,	stahlblau, dann braun,
Colchicin	zitronengelb,	gelblichbraun,
Morphin	blau, blau- bis olivengrün,	braun,
Narcein	grünlichgelb, dann violett,	dunkelviolett,
Narkotin	grünlich, stahlblau, dann kirschrot,	kirschrot,
Papaverin	grünlich, dunkel stahlblau, dann tiefviolett,	dunkelviolett,
Physostigmin . . .	bräunlichgelb,	schwach braunrot,
Thebain	tieforangefarben, allmählich verblassend,	dunkelbraun,
Veratrin	zitronengelb, olivengrün,	bräunlichviolett.

[1]) *Fröhdes* Reagens ist nicht lange unverändert haltbar. Man verwende daher stets das frisch bereitete Reagens. Vgl. „Die Bereitung der Reagenzien".

[2]) *A. Mecke,* Ein neues Reagens auf Alkaloide. Zeitschr. f. öffentl. Chem. **5.** 350 (1899) und Zeitschr. f. analyt. Chem. **39.** 468 (1900). Vgl. „Die Bereitung der Reagenzien".

Meckes Reagens ist somit vorzugsweise ein empfindliches Reagens auf die meisten Opiumalkaloide. Ein großer Vorzug dieses Reagenzes dürfte der sein, daß es die charakteristischen Färbungen auch mit den weniger reinen Alkaloiden gibt.

Marquis' Reagens oder Formalinschwefelsäure löst:
Apomorphin violett, rostrot, dunkelblau,
Codein rötlich, blauviolett, veilchenblau.
Dionin rein blau,
Heroin rot, dann blauviolett,
Morphin pfirsichrot, violett, blauviolett, rein blau,
Narkotin violett, olivengrün, gelb,
Papaverin weinrot, gelb, schmutzig braunrot, tief orange,
Peronin rotviolett,
Veratrin gelbbraun, beim Erwärmen rötlichbraun.

III. Die Untersuchung auf metallische Gifte.

Die Zerstörung der organischen Substanz nach dem Verfahren von Fresenius-v. Babo.[1]

Für diese Untersuchung kann der Rückstand, der nach dem Abdestillieren der flüchtigen Gifte im Destillationskolben bleibt, genommen werden, da er ja alle, in einem Untersuchungsmaterial etwa vorhandenen giftigen Metalle enthält. Oder man nimmt einen Teil des gut gemischten, vorher gehörig zerkleinerten, mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührten ursprünglichen Untersuchungsobjektes.[2] Man versetzt das auf Metallgifte zu untersuchende Material je nach der Menge, die zerstört werden soll, mit 10—20—30 cm^3 konzentrierter Salzsäure sowie mit 1—2 *g* chlorsaurem Kalium, stellt den Glaskolben auf ein kochendes Wasserbad, das sich unter einem gut ziehenden Abzuge befindet, und erhitzt unter häufigem Umschütteln, so daß das Chlor mit der zu zerstörenden Masse in möglichst innige Berührung kommt. Sobald der Inhalt des Glaskolbens genügend heiß geworden ist, setzt man unter fleißigem Umschütteln alle 2 bis 3 Minuten jeweils 0·3—0·5 *g* chlorsaures Kalium hinzu und fährt in dieser Weise fort, bis die organischen Stoffe größtenteils gelöst sind, bis also der Kolbeninhalt eine klare oder trübe, weingelb gefärbte Flüssigkeit bildet und bis auf erneuten Zusatz von chlorsaurem Kalium und fortge-

---

[1] *R. Fresenius* und *L. v. Babo*, Über ein neues, unter allen Umständen sicheres Verfahren zur Ausmittelung und quantitativen Bestimmung des Arsens bei Vergiftungsfällen. *J. Liebigs* Ann. d. Chem. u. Pharm. **49**. 287 (1844).

[2] Liegen irgend welche Leichenteile zur Untersuchung vor, so werden sie möglichst fein zerschnitten, mit 12·5%iger arsenfreier Salzsäure zu einem dünnen Brei angerührt, dann 1—2 *g* chlorsaures Kalium hinzugefügt und in der oben angegebenen Weise unter häufigem Umschütteln oder, falls man die Organteile in einer Porzellanschale erhitzt, unter fleißigem Umrühren auf einem Wasserbade erhitzt.

setztem Erhitzen eine wesentliche Veränderung des Gemisches nicht mehr eintritt. Besonders Fett ist äußerst widerstandsfähig gegen die Einwirkung des Chlors. Ist die „Zerstörung“ der organischen Substanz beendigt, so verdünnt man mit heißem Wasser, fügt zur vollständigen Abscheidung von etwa vorhandenem Baryum einige Tropfen verdünnte Schwefelsäure hinzu, schüttelt um und gießt die Flüssigkeit durch ein angefeuchtetes Filter. Enthält das Filtrat nicht zu viel freie Salzsäure, so kann es direkt mit Schwefelwasserstoffgas gesättigt werden. Andernfalls muß das Filtrat in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade fast zur Trockne eingedampft werden, um die freie Salzsäure größtenteils zu entfernen. Eine beim Eindampfen der Flüssigkeit auftretende Bräunung kann durch Hinzufügen einiger Kriställchen Kaliumchlorat jedesmal leicht wieder beseitigt werden.

Man kann auch in der Weise arbeiten, daß man die mit Hilfe von Salzsäure und chlorsaurem Kalium erhaltene und abfiltrierte Flüssigkeit erst durch Eindampfen auf ein kleineres Volumen von einem Teil der freien Salzsäure befreit, dann dieselbe mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt und schließlich mit verdünnter Salpetersäure gerade wieder ansäuert. Die so vorbereitete Flüssigkeit, die also nicht allzu viel freie Säure enthalten soll, wird mit arsenfreiem Schwefelwasserstoff gesättigt.

Der Filterrückstand, der beim Erhitzen des Destillationsrückstandes oder des ursprünglichen Untersuchungsobjektes mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium bleibt, kann außer Fett noch Silberchlorid, Baryumsulfat und Bleisulfat enthalten; er wird nach den unter „Metallgifte IV“ gemachten Angaben auf einen Gehalt an Baryum, Blei und Silber untersucht.

H. Thoms[1]) führt die „Zerstörung“ der organischen Substanz in einem besonders konstruierten Apparate aus. Als Zerstörungskolben kann ein gewöhnlicher Fraktionskolben verwendet werden, dessen seitliche Abflußröhre aufwärts gebogen ist. In dem Hals des Kolbens ist mittelst eines Stopfens ein Scheidetrichter befestigt, welcher mit einer, bei gewöhnlicher Temperatur gesättigten, wässerigen Lösung von chlorsaurem Kalium (1:20) gefüllt ist. In den Zerstörungskolben gibt man die mit 12·5%iger Salzsäure zu einem dünnen Brei angerührte organische Substanz (Leichenteile), fügt etwa 1 *g* festes chlorsaures Kalium hinzu und erwärmt den Kolben auf einem kochenden Wasserbade. Wenn die Masse im Zerstörungskolben warm geworden ist, läßt man unter fleißigem Umschütteln die Lösung des chlorsauren Kaliums zutropfen. Man hüte sich aber, auf einmal zu große Mengen dieser Lösung zufließen zu lassen. Im übrigen verfährt man nach den obigen Angaben.

Bemerkungen: Auch bei sehr gründlicher Behandlung von Leichenteilen oder pflanzlichen Stoffen mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium bleiben mehr oder weniger reichliche weiße Rückstände, die, zum Teil wenigstens, aus Fett, freien

[1]) *H. Thoms*, „Einführung in die praktische Nahrungsmittelchemie“. Erschienen im Verlag von S. Hirzel, Leipzig 1899. Abbildung 64. S. 163.

Fettsäuren (chlorierte Fettsäuren?) bestehen, und die gegen die Einwirkung von naszierendem Chlor äußerst widerstandsfähig sind. Ein Teil der organischen Substanz wird hierbei in stark riechende, die Schleimhäute reizende, flüchtige Verbindungen (Chloranil?) übergeführt. Man führe daher die Zerstörung der organischen Substanz mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium unter einem gut ziehenden Abzuge aus.

Durch die angegebene Behandlungsweise mit Salzsäure unter Zugabe von chlorsaurem Kalium werden die in irgend einem Untersuchungsobjekte vorhandenen Metallgifte in anorganische Salze, meist in Chloride und Sulfate, übergeführt, die entweder gelöst oder die wie Silberchlorid, Baryumsulfat und zum Teil auch Bleisulfat als schwer lösliche Verbindungen ausgefällt werden. Viele Schwermetalle, wie Quecksilber, Silber, Blei, Kupfer und Zink, werden aus ihren Salzlösungen durch Eiweißstoffe, die ja in allen tierischen und pflanzlichen Organismen und Säften enthalten sind, gefällt und in die in Wasser meist sehr schwer löslichen, zum Teil recht beständigen Metallalbuminate übergeführt. In diesen Metalleiweißverbindungen kann das betreffende Metall mit Hilfe der üblichen Reaktionen meist nicht ohne weiteres nachgewiesen werden. Auch manche organische Säuren, wie die Weinsäure, ferner Kohlehydrate, können den Nachweis der Schwermetalle mehr oder weniger stören. Die Schwermetalle in Verbindung mit derartigen organischen Substanzen verhalten sich ähnlich wie das Kupfer im Kaliumcuprocyanid $[Cu_2(CN)_6]K_4$, das weder durch Alkalilauge noch durch Schwefelwasserstoff ausgefällt wird, da es in Lösung nach der Gleichung

$$[Cu_2(CN)_6]K_4 \rightleftharpoons 4\overset{+}{K} + [Cu_2(CN)_6]^{----}$$

teilweise elektrolytisch dissoziiert ist und somit keine Kupferionen in Lösung schickt. Beim Erhitzen des Kaliumcuprocyanids mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium geht sein Kupfer als Chlorid in Lösung, das nun mit den oben angeführten Reagenzien Niederschläge gibt, da seine Lösung nach dem Schema

$$CuCl_2 \rightleftharpoons \overset{++}{Cu} + 2\overset{-}{Cl}$$

ionisiert ist und infolgedessen Cupriionen enthält.

Will man also die in Frage kommenden Metallgifte mit Hilfe der üblichen Ionenreaktionen nachweisen, so müssen die störenden organischen Substanzen auf irgend eine Weise erst beseitigt, also „zerstört" und die betreffenden Metalle in anorganische Salze übergeführt werden.

Chlorsaures Kalium wirkt nur in stark salzsaurer Lösung kräftig auf organische Stoffe ein. Sollte die zu zerstörende Masse während des Erhitzens zu sehr eingedickt werden, so verdünne man sie mit Wasser oder verdünnter Salzsäure. Während des Eintragens des chlorsauren Kaliums muß tüchtig umgeschüttelt werden, weil sich sonst am Boden des Glaskolbens in größerer Menge festes chlorsaures Kalium ansammelt, das zur Bildung des sehr explosiven Chlordioxydes (ClO_2) und infolgedessen zu Explosionen führen kann.

Verfasser verwendet für die Untersuchung von Leichenteilen eine 12·5%ige Salzsäure (spez. Gew. 1·061), die mit Schwefelwasserstoff gesättigt und in nur lose verschlossenen Flaschen aufbewahrt wird. Unter diesen Bedingungen werden die letzten Spuren von Arsen, die sich auch in der reinsten Salzsäure des Handels noch vorfinden können, ausgefällt. Vor ihrer Verwendung wird diese Salzsäure vom ausgeschiedenen Schwefel, der schwefelarsenhaltig sein kann, abfiltriert. Leichenteile werden von dem Salzsäurekaliumchloratgemisch verhältnismäßig rasch zerstört und größtenteils in Lösung übergeführt. Bei einem derartigen Versuche wurden 100 *g* vom Magen und Zwölffingerdarm, 20 *g* Mageninhalt, 75 *g* von der Niere und 200 *g* von der Leber, also zusammen 405 *g* Organteile von einer menschlichen Leiche, in der angegebenen Weise behandelt; im Verlaufe einer Stunde ging fast die ganze Masse in Lösung. Der ungelöst gebliebene, abfiltrierte und ausgewaschene Anteil dieser Leichenteile wog nach dem Trocknen auf einem Tonteller 52 *g*, nach dem Trocknen bei 100° nur 32 *g* und bildete dann eine gelblich weiße, sich fettig anfühlende, amorphe Masse.

Die Zerstörung mit freier Chlorsäure.

Sonnenschein und *Jeserich*[1]) nehmen statt des chlorsauren Kaliums reine Chlorsäure. Man versetzt die zerkleinerten, mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührten Leichenteile in einem geräumigen Glaskolben mit einigen Kubikzentimetern Chlorsäure und erwärmt langsam und vorsichtig auf dem Wasserbade. Sobald die Masse schwammig aufgetrieben erscheint, fügt man in kleinen Anteilen nach und nach Salzsäure hinzu. Selbst bei Verarbeitung größerer Mengen von Leichenteilen ist die Auflösung derselben in 2—3 Stunden erfolgt. Das Ende der „Zerstörung" der organischen Stoffe ist daran zu erkennen, daß sich unter einer fast weißen Fettschicht eine gelblich gefärbte, nahezu klare Flüssigkeit befindet. Das verdampfende Wasser muß von Zeit zu Zeit durch neues ersetzt werden, weil sonst die Reaktion explosionsartig verlaufen könnte. Im übrigen wird das Gemisch genau so wie bei dem Verfahren mit chlorsaurem Kalium und Salzsäure behandelt.

Die Zerstörung nach dem Verfahren von *C. Mai.*[2])

Man rührt die zerkleinerten Leichenteile mit Salzsäure (1·12) zu einem dünnen Brei an, fügt wenig chlorsaures Kalium hinzu, erhitzt über freier Flamme unter zeitweiligem Zusatz kleiner Mengen des chlorsauren Salzes (0·2 *g*) und läßt die Masse nach der sehr bald eintretenden Verflüssigung erkalten; das ausgeschiedene Fett läßt sich dann meist leicht von der Flüssigkeit abheben. Dieses wird noch ein- oder zweimal mit stark verdünnter Salpetersäure ausgekocht und das Filtrat mit der Hauptmenge der Flüssigkeit vereinigt. Diese wird nun unter Zugabe kleiner Mengen von Ammoniumpersulfat so lange weiter erhitzt, bis eine klare weißgelbe Lösung entstanden ist, die dann abfiltriert und in der üblichen Weise mit Schwefelwasserstoffgas gesättigt wird.

Ammoniumpersulfat ist ein kräftig wirkendes Oxydationsmittel, das zudem der zu oxydierenden Flüssigkeit keine Substanzen zuführt, die nicht flüchtig sind.

Die Untersuchung der abfiltrierten Lösung auf Metallgifte. Abscheidung durch Schwefelwasserstoff.

Die nach dem Verfahren von *Fresenius-v. Babo* oder nach einem der anderen Verfahren erhaltene und von einem Überschuß von Salzsäure größtenteils befreite abfiltrierte Lösung, die bei richtigem Arbeiten meist nur schwach gelb[3]) gefärbt ist, wird in einer Kochflasche auf dem

[1]) *P. Jeserich,* Repertorium der analytischen Chemie. 2. 379 (1882).

[2]) *C. Mai,* Kritische Gänge auf forensisch-chemischem Gebiet. Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel usw. 5. 1106 (1902).

[3]) Bei Vorhandensein von Chrom ist die erhaltene Lösung wie auch das Filtrat vom Schwefelwasserstoffniederschlag durch einen Gehalt an Chromchlorid mehr oder weniger grün gefärbt.

Wasserbade erhitzt und mit arsenfreiem Schwefelwasserstoffgas [1]) gesättigt. Man leitet in diese Lösung unter fortwährendem Erhitzen auf dem Wasserbade längere Zeit ½ bis 1 Stunde und länger Schwefelwasserstoff ein und fährt mit dem Einleiten von Schwefelwasserstoff bis zum Erkalten fort, nachdem man die Kochflasche von dem Wasserbade weggenommen hat.

Diese mit Schwefelwasserstoff gesättigte Flüssigkeit läßt man in der Kochflasche, die mit einem Stopfen nur lose verschlossen wird, mehrere Stunden, am besten bis zum anderen Tage, ruhig stehen. Riecht dann die Flüssigkeit noch stark nach Schwefelwasserstoff und wird ein darüber gehaltenes „Bleipapier" beim Umschütteln geschwärzt, so kann sie weiter verarbeitet werden; ist dies aber nicht der Fall, so wird die Flüssigkeit nochmals auf dem Wasserbade erwärmt und von neuem mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Schließlich wird der durch Schwefelwasserstoff erzeugte Niederschlag abfiltriert und mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser ausgewaschen.

Der erhaltene Niederschlag wird auf Arsen, Antimon, Zinn, Quecksilber, Blei, Kupfer, Wismut und Kadmium (Metallgifte I und II) und das Filtrat von diesem Niederschlage auf Chrom und Zink (Metallgifte III) untersucht.

Es ist zu beachten, daß pflanzliche und tierische Stoffe, also auch Leichenteile, bei der Behandlung mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium häufig Flüssigkeiten liefern, die, auch bei Abwesenheit von Metallen dieser Gruppe, mit Schwefelwasserstoff gelbrot, braunrot oder dunkelbraun gefärbte Niederschläge [2]) geben können.

Entsteht also bei toxikologischen Untersuchungen in saurer Lösung mit Schwefelwasserstoff ein gefärbter Niederschlag, so darf man durch diesen nie zu der vorgefaßten Meinung geführt werden, als müsse ein Metallgift unbedingt vorhanden sein! Auch aus der Farbe des erhaltenen Schwefelwasserstoffniederschlags kann nicht ohneweiters auf das Vorhandensein eines bestimmten Metalls geschlossen werden.

Kontrollversuch. Einen Teil des Filtrats vom Schwefelwasserstoffniederschlage versetzt man vor der Prüfung desselben auf Chrom und Zink mit etwa der 10fachen Menge gesättigtem Schwefelwasserstoff-

[1]) Arsenfreien Schwefelwasserstoff stellt man am bequemsten in der folgenden Weise her: Aus rohem, käuflichem Schwefeleisen und roher Salzsäure entwickeltes Schwefelwasserstoffgas wird in verdünnte Natronlauge bis zur Sättigung eingeleitet; die erhaltene Lösung des Natriumsulfhydrats (NaSH) bringt man in einen Kugeltrichter (Scheidetrichter) und läßt sie in mäßig verdünnte Schwefelsäure (1 + 4) fließen, wobei die sofort einsetzende Entwicklung von völlig arsenfreiem Schwefelwasserstoff sich nach Belieben leicht regulieren läßt.

[2]) Völlig ausgewaschenes Kasein und Fibrin gehen bei wiederholter Behandlung mit Kaliumchlorat und Salzsäure fast vollständig in Lösung und liefern ein Filtrat, aus welchem Schwefelwasserstoff schmutziggelb bis bräunlich gefärbte, amorphe Niederschläge fällt; diese Niederschläge enthalten neben viel freiem Schwefel schwefelhaltige organische Substanzen.

wasser, schüttelt um und läßt einige Minuten stehen. Entsteht hierbei kein gefärbter Niederschlag, so sind von den in Frage kommenden Metallen (Metallgifte I und II) auch keine mehr in der Lösung vorhanden und es kann dann das Filtrat auf Chrom und Zink (Metallgifte III) weiter verarbeitet werden. Andernfalls ist das gesamte Filtrat von dem mit Schwefelwasserstoff entstandenen Niederschlag erst mit Wasser stark zu verdünnen und nochmals mit Schwefelwasserstoff zu sättigen. Blei und Kadmium werden nämlich bei Gegenwart von viel Salzsäure durch Schwefelwasserstoff nicht vollständig ausgefüllt (siehe oben).

Ausziehen des „Schwefelwasserstoffniederschlags" mit Ammoniak-Schwefelammonium. Der mit Schwefelwasserstoff erhaltene, ausgewaschene und noch feuchte Niederschlag wird auf dem Filter mit einer heißen Mischung aus annähernd gleichen Teilen Ammoniak und gelbem Schwefelammonium gründlich ausgezogen. Dies geschieht in der Weise, daß man das zum Sieden erhitzte Ammoniak-Schwefelammoniumgemisch, 5—10 cm^3, auf den Niederschlag, der sich auf dem Filter befindet, träufelt, das abfließende Filtrat erwärmt, dann wiederum auf den Niederschlag zurückgießt und diese Operation noch einige Male wiederholt. Schließlich spült man das Filter noch mit wenigen Kubikzentimetern eines neuen Ammoniak-Schwefelammoniumgemisches aus. Das aufgesammelte Filtrat muß auf Arsen, Antimon, Zinn und Kupfer[1]) = Metallgifte I, der Filterrückstand auf Quecksilber, Blei, Kupfer, Wismut und Kadmium = Metallgifte II untersucht werden.

Metallgifte I.

Arsen, Antimon, Zinn, Kupfer.

Die Untersuchung des im Ammoniak-Schwefelammonium löslichen Teiles vom Schwefelwasserstoffniederschlage.

Der nach den obigen Angaben mit Hilfe einer heißen Ammoniak-Schwefelammoniummischung hergestellte, durch gelöste organische Stoffe meist stark dunkelbraun gefärbte Auszug des „Schwefelwasserstoffniederschlags" wird in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, der bleibende Rückstand nach dem Erkalten mit rauchender Salpetersäure durchfeuchtet, dann wiederum eingedampft. Der

[1]) Schwefelkupfer, CuS, ist in heißem, gelbem Schwefelammonium in erheblicher Menge löslich. — Beim Behandeln einer kupferhaltigen Schwefelammoniumlösung nach dem weiter unten beschriebenen Verfahren entsteht Kupferoxyd, welches der Schmelze ein mehr oder weniger graues oder schwarzes Aussehen erteilt. Wird die Schmelze mit Wasser ausgezogen, so bleibt schwarzes Kupferoxyd eventuell neben Zinnoxyd und pyroantimonsaurem Natrium im Rückstande. Zum Nachweis des Kupfers löst man den schwarzen Rückstand in wenig verdünnter heißer Salzsäure auf und teilt die erhaltene Lösung in zwei Teile: den einen Teil versetzt man mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion: Blaufärbung der Lösung, den anderen Teil mit Ferrocyankalium: braunroter Niederschlag von Ferrocyankupfer, $[Fe(CN)_6]Cu_2$ zeigen dann Kupfer an.

hierbei bleibende Rückstand wird mit etwa der dreifachen Menge einer Mischung aus zwei Teilen Natronsalpeter und einem Teile trockener Soda innig verrieben, dieses Gemisch auf dem Wasserbade gut ausgetrocknet, dann in kleinen Mengen in einen glühenden Porzellantiegel, der wenig geschmolzenen Natronsalpeter enthält, allmählich eingetragen. Ist das ganze Gemisch in den Tiegel eingetragen, so wird dieser noch kurze Zeit erhitzt, bis nämlich der Inhalt des Tiegels zu einer farblosen Flüssigkeit zusammengeschmolzen ist. Nur bei Vorhandensein von Kupfer ist die Schmelze durch entstandenes Kupferoxyd grau oder grauschwarz gefärbt. Die erhaltene Schmelze, welche arsensaures, pyroantimonsaures und zinnsaures Natrium sowie Zinnoxyd und Kupferoxyd enthalten kann, weicht man nach dem Erkalten mit heißem Wasser auf, spült sie in eine Kochflasche und fügt zu der so erhaltenen klaren oder trüben Flüssigkeit ein wenig Natriumbikarbonat, um die kleinen Mengen von etwa gelöstem zinnsauren Natrium zu zersetzen und das gesamte Zinn als Zinnsäure (Zinnoxyd) zur Abscheidung zu bringen; alsdann filtriert man ab.

Das Filtrat (A) enthält dann etwa vorhandenes Arsen als arsensaures Natrium, AsO_4Na_2H, während der Filtrierrückstand (B) pyroantimonsaures Natrium, $Sb_2O_7Na_2H_2$, Zinnoxyd und Kupferoxyd enthalten kann.[1])

Die Untersuchung des erhaltenen Filtrates A auf Arsen nach dem Verfahren von *Marsh*.

Man säuert die nach den obigen Angaben bereitete und abfiltrierte Lösung der Schmelze, also das Filtrat A, welches vorhandenes Arsen als arsensaures Natrium enthalten kann, mit verdünnter arsenfreier Schwefelsäure stark an, dämpft sie in einem Porzellanschälchen auf einer Asbestplatte über kleiner Flamme ein, versetzt den Rückstand zur vollständigen Entfernung von etwa noch vorhandener Salpetersäure mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und erhitzt nun weiter, bis die schweren weißen, senkrecht in die Höhe steigenden Dämpfe der Schwefelsäure in reichlicher Menge auftreten. Der Rückstand[2]) im Porzellanschälchen bildet dann eine dicke, farblose, stark sauer reagierende Flüssigkeit, die etwa vorhandenes Arsen als Arsensäure (AsO_4H_3) enthält und die beim Erkalten häufig zu einer weißen Kristallmasse erstarrt. Die Lösung dieses Rückstandes in Wasser wird im *Marsh*schen Apparate auf einen Gehalt an Arsen untersucht.

---

[1]) Auch bei Abwesenheit der unter B angeführten Stoffe erhält man in der Regel einen geringen, wasserunlöslichen Rückstand, der vom Porzellantiegel herrühren kann, dessen Glasur durch die Salpeter-Sodaschmelze teilweise aufgeschlossen wird.

[2]) Um sicher zu sein, daß die Salpetersäure vollständig entfernt ist, untersuche man einige Tropfen dieses Rückstandes nach dem Vermischen mit konzentrierter Schwefelsäure mit Hilfe von Ferrosulfatlösung auf einen Gehalt an Salpetersäure.

Man bringt in die Entwicklungsflasche des Apparates von *Marsh* arsenfreies Zink[1], gekörnt oder in kleineren Stangen, in einer Menge von 20—25 *g* und gießt durch die Trichterröhre eine mäßig verdünnte, kalte Schwefelsäure mit 15—16⁰/₀iger SO_4H_2[2] dazu. Die Wasserstoffentwicklung darf keine allzu lebhafte sein, weil sonst die Flüssigkeit in der Entwicklungsflasche sich zu stark erwärmen könnte; in diesem Fall kann nämlich die Schwefelsäure zum Teil zu schwefeliger Säure und weiterhin zu Schwefelwasserstoff reduziert werden, wodurch dann der Nachweis des Arsens mehr oder weniger beeinträchtigt wird.

Wird die Entwicklungsflasche zu warm, so muß sie durch Einstellen in eine mit kaltem Wasser gefüllte Schale gekühlt werden. Beim Operieren mit dem Apparat von *Marsh* hat man folgende Vorsichtsmaßregeln zu beobachten:

1. Man hat sich zunächst davon zu überzeugen, daß der Apparat vollkommen dicht ist.

2. Der Wasserstoff muß vor dem Entzünden möglichst frei von Luft sein; dies ist der Fall, wenn das in einem trockenen Reagensglase aufgesammelte Wasserstoffgas beim Entzünden ohne Detonation verbrennt; der aus der Kaliglasröhre ausströmende Wasserstoff kann dann ohne jede Gefahr einer Explosion des Apparates entzündet werden. Ist der Apparat dicht und die Wasserstoffentwicklung eine nicht zu lebhafte, so ist die Luft im Apparate in etwa 6 bis 8 Minuten verdrängt.

3. Man hat hierauf den Nachweis zu führen, daß der Wasserstoff völlig frei von Arsen ist; er darf für sich keinen Arsenspiegel und keine Arsenflecke geben.

Ist der Wasserstoff arsenfrei, so bringt man die erhaltene wässerige, schwefelsaure Lösung der Schmelze, die Arsensäure enthalten kann, in kleinen Mengen allmählich in die Entwicklungsflasche, indem man gleichzeitig die Reduktionsröhre des Apparates zur stärksten Rotglut erhitzt. Ist die fragliche Lösung arsenhaltig, so mischt sich dem Wasserstoff alsbald Arsenwasserstoff bei, und es bildet sich, unter Umständen schon nach einigen Minuten, in der Kaliglasröhre, nämlich hinter der stark erhitzten Stelle, ein glänzender, mehr oder weniger schwarzer Arsenspiegel. Sind nur minimale Spuren von Arsen vorhanden, so scheidet sich im engeren Teile der Reduktionsröhre erst nach längerer Zeit ein brauner oder schwarzbrauner Anflug von Arsen ab. Hält man hinter den Arsenspiegel ein Stück weißes Papier, so ist selbst ein minimaler Arsenanflug noch deutlich zu erkennen. Nimmt man hierauf den Bunsenbrenner von der Kaliglasröhre weg, so färbt sich die Wasserstoffflamme

---

[1] Ein Zink, von welchem 15—20 *g* mit arsenfreier Schwefelsäure während einer Stunde in der stark erhitzten Kaliglasröhre des *Marsh*schen Apparates keinen Anflug von Arsen, also keine Spur eines Arsenspiegels, liefert, ist praktisch genommen arsenfrei und für gerichtlich-chemische Untersuchungen geeignet.

[2] Eine für den *Marsh*schen Apparat geeignete Säure erhält man durch Mischen von 5 Vol. Wasser mit 1 Vol. arsenfreier, konzentrierter Schwefelsäure.

bei Vorhandensein von Arsen bläulichweiß und es steigen gleichzeitig aus der Flamme weiße Dämpfe von Arsentrioxyd auf. Hält man jetzt in die Wasserstoffflamme eine kalte Porzellanschale, so entsteht auf ihr ein glänzender, schwarzer Fleck, ein sogenannter Arsenfleck, wenn Arsen zugegen ist. Auch an seinem charakteristischen Knoblauchgeruche kann der Arsenwasserstoff leicht erkannt werden, wenn man die Wasserstoffflamme auslöscht und das Gas ausströmen läßt. Sind dem Wasserstoff selbst nur Spuren von Arsenwasserstoff beigemengt, so macht sich der letztere durch seinen Geruch bemerkbar.

Auf einem dritten Wege kann das Arsen mit Hilfe des *Marsh*schen Apparates nachgewiesen werden, wenn man den fraglichen Wasserstoff nach dem Löschen der Flamme in eine verdünnte, neutrale Lösung von Silbernitrat einleitet. Ist der Wasserstoff arsenhaltig, so färbt sich die Silbernitratlösung erst dunkel, und es scheidet sich alsbald ein schwarzer Niederschlag von metallischem Silber ab, während arsenige Säure und freie Salpetersäure in Lösung gehen. Filtriert man das ausgeschiedene Silber durch ein Doppelfilterchen ab und fügt zum klaren Filtrat, nämlich zur Neutralisation der freien Säure, mit Hilfe eines Glasstabes wenige Tröpfchen stark verdünnte Ammoniakflüssigkeit hinzu, so kann man den gelblichweißen, flockigen Niederschlag von arsenigsaurem Silber, AsO_3Ag_3, hervorrufen. Da dieser Niederschlag in Salpetersäure und in Ammoniak leicht löslich, kann er nur in einer neutralen Lösung entstehen.

Hält man über die Öffnung der Reduktionsröhre des *Marsh*schen Apparates, nachdem die Flamme gelöscht ist, einen Papierstreifen, der mit einer konzentrierten Silbernitratlösung (1 + 1) befeuchtet ist, so färbt er sich gelb, wenn der ausströmende Wasserstoff Arsenwasserstoff enthält; wird der gelbe Flecken auf dem Papierstreifen mit Wasser befeuchtet, so nimmt er eine schwarze Färbung an. *Gutzeit*sche Arsenprobe.

Unterschiede zwischen Arsen- und Antimonflecken, Arsen- und Antimonspiegeln.

Der Antimonwasserstoff, SbH_3, der durch Einwirkung von Wasserstoff in statu nascendi auf verschiedene Antimonpräparate (wie $SbCl_3$, Sb_2O_3, $HSbO_3$, Brechweinstein) entsteht, verhält sich im *Marsh*schen Apparate ähnlich wie der Arsenwasserstoff, d. h. er bildet Flecke und Spiegel und fällt aus einer Silbernitratlösung einen schwarzen Niederschlag, der freilich nicht aus metallischem Silber, sondern aus Antimonsilber ($SbAg_3$) besteht.

Obwohl das Arsen nach dem angegebenen Verfahren quantitativ vom Antimon getrennt wird und somit ein antimonhaltiges Arsen bei der Prüfung im Apparate von *Marsh* so gut wie ausgeschlossen ist, so scheint es doch angezeigt zu sein, an dieser Stelle die Unterschiede von Arsen und Antimon anzugeben, zumal es stets nötig sein wird, erhaltene Arsenflecke und Arsenspiegel als solche näher zu charakterisieren. Auch ist es in vielen, zumal zweifelhaften Fällen, wenn man also glaubt Antimon

gefunden zu haben, geboten, mit der vermutlich antimonhaltigen Flüssigkeit im *Marsh*schen Apparate Antimonflecke und Antimonspiegel zu erzeugen, um die Anwesenheit des Antimons weiter zu bestätigen. (Siehe bei Antimon.)

Die folgenden Unterschiede zwischen Arsen- und Antimonflecken, Arsen- und Antimonspiegeln sind bemerkenswert:

a) Der Arsenspiegel ist stark metallisch-glänzend, schwarzbraun und leicht beweglich, d. h. er läßt sich infolge seiner großen Flüchtigkeit durch Erhitzen im Wasserstoff leicht weiter sublimieren. — Der Antimonspiegel ist direkt hinter der erhitzten Stelle, wo er zusammenschmilzt, silberweiß, in den der Flamme entfernteren Lagen fast schwarz und wenig glänzend; da Antimonwasserstoff schon bei niedrigerer Temperatur zersetzt wird als Arsenwasserstoff, scheidet sich das Antimon auch vor der erhitzten Stelle aus. Der Antimonspiegel ist bei höherer Temperatur flüchtig und läßt sich daher weniger leicht sublimieren.

b) Der Arsenfleck ist glänzend, schwarzbraun, an weniger dichten Stellen schön braun und in Natriumhypochloritlösung zu arseniger Säure leicht löslich: $3H_2O + 2As + 3(O\,NaCl) = 2\,AsO_3H_3 + 3\,NaCl$.

Der Antimonfleck ist nicht glänzend, matt, sammetschwarz, auch in dünnen Schichten niemals braun, sondern dunkel, graphitartig und in Natriumhypochloritlösung unlöslich.

c) Der Arsenfleck wird von einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure oder von feuchtem Chlor leicht zu Arsensäure gelöst; setzt man hierauf Silbernitrat hinzu und neutralisiert mit Ammoniak, so bildet sich ein rötlicher Niederschlag von Silberarseniat, AsO_4Ag_3.

Der Antimonfleck verschwindet gleichfalls durch Salpetersäure oder feuchtes Chlor; Silbernitrat gibt aber keinen gefärbten Niederschlag.

d) Ein Arsenspiegel, der sich in der Kaliglasröhre befindet, gibt bei gelindem Erhitzen im trockenen Schwefelwasserstoffstrome gelbes Arsentrisulfid; ein Antimonspiegel färbt sich unter denselben Bedingungen braunrot (Kermesfarben) bis schwarz unter Bildung von Antimontrisulfid.

e) Auch in dem Verhalten gegen verdünnte Silbernitratlösung zeigen sich Arsen- und Antimonwasserstoff verschieden; in beiden Fällen entstehen schwarze Niederschläge. Durch Arsenwasserstoff wird aber metallisches Silber gefällt und im Filtrate davon läßt sich arsenige Säure nachweisen; der Antimonwasserstoff dagegen fällt Antimonsilber (Ag_3Sb) und in der abfiltrierten Flüssigkeit ist keine Spur von Antimon zu finden. Zum Nachweise des Antimons wird der schwarze Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen und mit einer 10—15%igen Weinsäurelösung tüchtig ausgekocht, wobei das Antimon vollständig in Lösung geht, während das Silber als grauweißer Rückstand bleibt. Beim Einleiten von Schwefelwasserstoff in die mit verdünnter Salzsäure versetzte weinsaure Antimonlösung wird orangerotes Schwefelantimon gefällt.

Die Untersuchung des Filterrückstandes B auf Antimon, Zinn und Kupfer.

Der oben erhaltene, in Wasser unlösliche Rückstand (B) der Schmelze, der pyroantimonsaures Natrium, Zinnoxyd und Kupferoxyd enthalten kann, wird auf dem Filter mit heißer, mäßig verdünnter Salzsäure (gleiche Teile konzentrierte Säure und Wasser) wiederholt übergossen, bis alles oder fast alles in Lösung gegangen ist. War die Schmelze und der Filterrückstand B grau oder schwarz gefärbt, so untersucht man zunächst einen Teil der erhaltenen salzsauren Lösung mit überschüssigem Ammoniak (Blaufärbung) und mit Ferrocyankalium (braunroter Niederschlag oder braunrote Färbung) auf Kupfer. — Den übrigen Teil der salzsauren Lösung dampft man in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade bis auf wenige Tropfen ein und bringt 2 oder 3 Tropfen davon auf einem Platinblech mit einem Stückchen Zink zusammen; bei Gegenwart von Antimon entsteht auf dem Platinblech ein tiefschwarzer Fleck. — Zinn bewirkt einen grauen und Kupfer einen dunkelrotbraunen Fleck auf dem Platinblech. Beide Flecken können nicht gut mit dem Antimonfleck verwechselt werden. — Den noch vorhandenen Rest der salzsauren Lösung des Filterrückstandes B verdünnt man mit etwas Wasser, fügt ein Stückchen Zink hinzu und läßt stehen, bis die Wasserstoffentwicklung beendigt ist. Schwarze Metallflocken, die sich hierbei ausscheiden, werden auf einem Filterchen gesammelt, gut ausgewaschen, dann mit wenig konzentrierter Salzsäure gelinde erwärmt und eventuell filtriert. Antimon bleibt hierbei ungelöst, während Zinn als Zinnchlorür in Lösung geht und in der abfiltrierten Lösung durch die folgenden Proben erkannt wird:

a) Einen Teil des Filtrats versetzt man mit einigen Tropfen Quecksilberchloridlösung; ist es zinnhaltig, so wird weißes Quecksilberchlorür gefällt, das beim Erwärmen in graues, metallisches Quecksilber übergeht, falls Zinnchlorür im Überschusse vorhanden ist.

b) Ein anderer Teil des Filtrates gibt mit einigen Tropfen einer stark verdünnten Mischung aus Ferrichlorid und Ferricyankalium einen blauen Niederschlag von Berlinerblau, falls er Zinn enthält. Diese Probe ist nicht so charakteristisch für Zinn, denn es gibt viele Substanzen, welche Ferri-Ferricyanid zu Berlinerblau reduzieren.

Zum weiteren Nachweise des Antimons löst man die in Salzsäure ungelöst gebliebenen schwarzen Flocken in einigen Tropfen heißem Königswasser, verdampft die überschüssige Säure auf dem Wasserbade und verdünnt den Rückstand mit Wasser. Liegt nicht zu wenig Antimon vor, so wird hierbei weißes Antimonoxychlorid gefällt, das sich in wenig verdünnter Salzsäure wieder löst. Einen Teil dieser salzsauren Lösung prüft man mit Schwefelwasserstoff auf Antimon und einen anderen Teil bringt man in den Apparat von *Marsh*, um Antimonflecke und Antimonspiegel zu erzeugen, bzw. um den Antimonwasserstoff mit Silbernitrat nachzuweisen. Vgl. Vorhergehendes.

Metallgifte II.

Quecksilber, Blei, Kupfer, Kadmium, Wismut.

Die Untersuchung des in Schwefelammonium unlöslichen Teiles vom Schwefelwasserstoffniederschlage.

Der in dem Ammoniak-Schwefelammoniumgemisch unlösliche Teil des Schwefelwasserstoffniederschlags, welcher die Sulfide von Quecksilber, Blei, Kupfer, Kadmium und Wismut enthalten kann, läßt sich fast immer direkt nach dem allgemeinen qualitativ-analytischen Gange verarbeiten. Liegt nur wenig Niederschlag vor, so übergießt man ihn auf dem Filter wiederholt mit einigen Kubikzentimetern heißer, mäßig verdünnter Salpetersäure. (1 Vol. konzentrierter Säure und 2 Vol. Wasser.) Quecksilbersulfid bleibt hierbei ungelöst, während die Sulfide von Blei, Kupfer, Wismut und Kadmium als salpetersaure Salze in Lösung gehen.

Die Untersuchung des Filterrückstandes auf Quecksilber.

Ein Rückstand, der hierbei auf dem Filter bleibt, muß stets auf Quecksilber untersucht werden, auch wenn er nicht schwarz gefärbt ist!

Man übergießt diesen Rückstand auf dem Filter wiederholt mit wenig heißer, mäßig verdünnter Salzsäure, in der man vorher einige Kriställchen chlorsaures Kalium gelöst hat, dampft das Filtrat in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in 2 bis 3 *cm*³ salzsäurehaltigem Wasser auf, filtriert und untersucht das klare Filter in der folgenden Weise auf Quecksilber.

a) Einen Teil des Filtrats versetzt man mit einigen Tropfen Zinnchlorürlösung; bei Vorhandensein von Quecksilber entsteht ein weißer Niederschlag von Quecksilberchlorür, der auf weiteren Zusatz von Zinnchlorür, besonders beim Erwärmen, zu grauem metallischem Quecksilber reduziert wird.

b) Einige Tropfen des Filtrats bringt man auf ein blankes Kupferblech, auf dem sich bei Anwesenheit von Quecksilber sofort ein grauer, beim Reiben glänzend werdender Fleck bildet. Wird das Kupferblech, auf dem sich Quecksilber befindet, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgewaschen, getrocknet und in einer engen, schwer schmelzbaren Röhre erhitzt, so sublimiert Quecksilber über, welches mit einer Spur Joddampf sich alsbald in das schön rot gefärbte Quecksilberjodid, HgJ_2, verwandelt.

c) Einen Teil des Filtrats erwärmt man gelinde mit phosphoriger Säure; enthält die Lösung Quecksilber, so entsteht ein weißer Niederschlag von Quecksilberchlorür.

d) Den Rest der Lösung versetzt man vorsichtig mit 1—2 Tröpfchen stark verdünnter Jodkaliumlösung: ein roter, im Überschusse des Fällungsmittels leicht löslicher Niederschlag (HgJ_2) zeigt Quecksilber an.

Die Untersuchung der salpetersauren Lösung.

Die erhaltene salpetersaure Lösung, welche die Nitrate von Blei. Kupfer. Wismut und Kadmium enthalten kann, wird in einem Porzellanschälchen fast zur Trockne eingedampft, der Rückstand in wenig heißem Wasser gelöst und die filtrierte, klare Lösung mit verdünnter Schwefelsäure versetzt. Bei Vorhandensein von Blei entsteht ein schwerer, weißer, in basisch weinsaurem Ammonium löslicher Niederschlag von Bleisulfat.

Die vom Bleisulfatniederschlage abfiltrierte oder die mit verdünnter Schwefelsäure klar gebliebene Flüssigkeit wird mit überschüssigem Ammoniak versetzt; eine hierbei auftretende Blaufärbung zeigt dann Kupfer an. Entsteht gleichzeitig ein weißer Niederschlag, so kann dieser aus Wismuthydroxyd bestehen. Zum sicheren Nachweise des Wismuts wird der Niederschlag abfiltriert, ausgewaschen, auf dem Filter in möglichst wenig heißer verdünnter Salzsäure gelöst und diese Lösung in zwei Teile geteilt. Den einen Teil gießt man in viel Wasser, womit ein weißer Niederschlag von Wismutoxychlorid gefällt wird, falls Wismut vorhanden ist. Den zweiten Teil versetzt man erst mit Zinnchlorür und macht dann mit Natronlauge alkalisch, um den schwarzen Niederschlag von metallischem Wismut zu erzeugen.

Zum Nachweis des Kadmiums neben Kupfer versetzt man die mit überschüssigem Ammoniak erhaltene, eventuell vom Wismuthydroxyd abfiltrierte, blaue Lösung mit Cyankalium bis zur Entfärbung und fügt starkes Schwefelwasserstoffwasser hinzu. Kadmium wird als gelbes Sulfid gefällt, während Kupfer als Kaliumcuprocyanid in Lösung bleibt. — Ist kein Kupfer vorhanden, hat sich also die Lösung auf Zusatz von Ammoniak nicht blau gefärbt, so versetzt man dieselbe zur Prüfung auf Kadmium direkt mit Schwefelwasserstoffwasser. — Erhält man hierbei nicht einen gelben, sondern einen rötlich oder bräunlich gefärbten Niederschlag, so filtriert man ihn ab und erhitzt ihn auf der Kohle mit der Lötrohrflamme: es wird ein brauner Beschlag erhalten, wenn der fragliche Niederschlag kadmiumhaltig ist.

Metallgifte III.

Die Untersuchung auf Chrom und Zink.

Das Filtrat von dem durch Schwefelwasserstoff erhaltenen Niederschlage muß noch auf Chrom und Zink untersucht werden. Es wird erst in einer flachen Porzellanschale auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingedampft, dann in zwei Teile geteilt.

Die eine Hälfte wird zur Prüfung auf Zink zuerst mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt, wobei gewöhnlich eine Dunkelfärbung der Flüssigkeit eintritt, dann mit Schwefelammonium im Überschusse. Hierbei entsteht fast immer ein Niederschlag, auch wenn Zink nicht vorhanden ist, da es in solchen Flüssigkeiten aus tierischen oder pflanzlichen Substanzen niemals an Eisen enthaltenden Verbindungen und an Phos-

phaten der Erd- und Erdalkalimetalle fehlt. Nachdem sich der Niederschlag abgesetzt hat, fügt man Essigsäure bis zur schwachsauren Reaktion hinzu, schüttelt tüchtig durch und läßt die Mischung einige Zeit stehen. Hierdurch wird der Niederschlag heller, indem das gefällte Schwefeleisen von der Essigsäure zum Teil gelöst wird; ebenso gehen die Phosphate zum Teil in Lösung, ausgenommen Ferriphosphat, $FePO_4$, das in Essigsäure fast unlöslich ist. Der bleibende Niederschlag wird auf einem Filterchen gesammelt, ausgewaschen, getrocknet und samt Filter im Porzellantiegel geglüht. Man durchfeuchtet hierbei das Filter vor dem Glühen mit einer konz. Lösung von Ammoniumnitrat, um zu verhindern, daß durch den Kohlenstoff des Filters beim Glühen metallisches Zink reduziert wird, das sich verflüchtigen könnte. Den Glührückstand kocht man mit verdünnter Schwefelsäure aus, filtriert ab und teilt das Filtrat in zwei Teile.

a) Den einen Teil des Filtrates versetzt man mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion, schüttelt gut um, filtriert einen hierbei fast immer entstehenden weißen Phosphatniederschlag ab, versetzt das klare Filtrat mit einigen Tropfen Schwefelammonium oder Schwefelwasserstoffwasser und erwärmt. Ist Zink vorhanden, so entsteht jetzt ein weißer, flockiger Niederschlag von Zinksulfid.

b) Den zweiten Teil des Filtrats übersättigt man mit Ammoniak, filtriert einen sich bildenden Niederschlag ab, säuert das Filtrat mit Essigsäure an, erwärmt es und leitet Schwefelwasserstoff ein; vorhandenes Zink wird hierbei als weißes Sulfid gefällt.

c) Zum weiteren Nachweise des Zinks löst man den nach *a* oder *b* mit Schwefelammonium oder Schwefelwasserstoff erhaltenen, abfiltrierten und ausgewaschenen Niederschlag auf dem Filter in einigen Tropfen heißer, verdünnter Salzsäure, kocht einige Zeit, um den Schwefelwasserstoff zu entfernen, filtriert den ausgeschiedenen Schwefel ab und versetzt das klare, erkaltete Filtrat mit Ferrocyankaliumlösung. Hierbei wird Zink als weißes, schleimiges Ferrocyanzink gefällt, das in kalter, verdünnter Salzsäure fast unlöslich ist.

Der zweite Teil des auf etwa ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingedampften Filtrates vom Schwefelwasserstoffniederschlage wird, zur Prüfung auf Chrom[1]), in einer Porzellanschale stark eingedampft, hierauf mit etwa der doppelten Menge Salpeter sowie mit Soda bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt und zur Trockne gebracht. Den erhaltenen Trockenrückstand trägt man in kleinen Portionen in einen glühenden Tiegel ein, in dem sich geschmolzener Salpeter befindet; sind größere Mengen Substanz zu verschmelzen, so nimmt man zweckmäßig einen blanken, geräumigen Nickeltiegel, der sich für derartige Schmelzen sehr gut eignet. Nachdem die Masse im Tiegel zusammengeschmolzen ist, läßt man erkalten, zieht die Schmelze mit heißem Wasser aus und filtriert ab. Bei

---

[1]) Das in Säuren unlösliche Chromoxyd, Cr_2O_3, ist bei der Aufsuchung auf metallische Gifte nicht zu berücksichtigen, weil es nicht giftig ist.

Gegenwart von Chrom ist das Filtrat mehr oder weniger intensiv gelb gefärbt; durch die gelbe Färbung werden selbst noch Spuren von Chrom erkannt.[1] Ist die Lösung der Schmelze aber farblos, so ist eine weitere Prüfung auf Chrom unnötig; ein gelb gefärbtes Filtrat teilt man zum sicheren Nachweise des Chroms in zwei Teile.

a) Den einen Teil säuert man mit Essigsäure an, kocht einige Minuten, um Kohlensäure und salpetrige Säure auszutreiben, und fügt einige Tropfen Bleiacetatlösung hinzu: ein gelber Niederschlag (CrO_4Pb) zeigt dann Chrom an. Ist das Bleichromat mit viel Bleisulfat und Bleichlorid gemengt, so ist der Niederschlag nur gelblich gefärbt. — Einen weißen Niederschlag, der aus $PbSO_4 PbCl_2 . Pb_3(PO_4)_2$ bestehen kann, erhält man fast immer, auch wenn der wässerige Auszug der Schmelze farblos ist.

Beim Vermischen der Lösungen von Kaliumnitrit, das ja bei derartigen Schmelzen aus Kaliumnitrat entsteht, Bleiacetat und Essigsäure erhält man eine intensiv gelb gefärbte Lösung, in welcher ein weißer Niederschlag gelblich gefärbt erscheinen kann. Um in einem solchen Falle jeden Irrtum auszuschließen, läßt man den Niederschlag absitzen, sammelt ihn auf einem Filterchen und wäscht ihn gut aus; ist er jetzt rein weiß, so ist Chrom nicht zugegen.

b) Den zweiten Teil des gelben Filtrates versetzt man mit schwefliger Säure; die gelbe Farbe geht hierbei in Grün oder Grünblau über unter Bildung von Chromalaun. Diese Probe ist nicht so empfindlich, wie die unter *a)* angegebene Chromgelbreaktion.

Metallgifte IV.

Die Untersuchung des beim Behandeln mit Kaliumchlorat und Salzsäure bleibenden Rückstandes auf Baryum, Blei und Silber.

Man spült den Rückstand, der beim Behandeln des Untersuchungsobjektes mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium ungelöst geblieben ist, gründlich mit heißem Wasser aus, trocknet ihn im Luftbad oder auf einem Tonteller gut aus, verreibt ihn dann, eventuell samt Filter, mit etwa der dreifachen Menge einer Mischung aus 2 Teilen Salpeter und 1 Teil trockenem Natriumkarbonat und trägt dieses Gemisch nach und nach in einen glühenden Porzellantiegel ein. Hierbei werden die organischen Stoffe (Fett, Fettsäuren etc.) unter Verpuffung und Feuererscheinung durch den Salpeter oxydiert, von dem man zuletzt, wenn alles in den Tiegel eingetragen ist, noch etwa 1 Gramm zugibt. Die geschmolzene Masse weicht man nach dem Erhalten mit heißem Wasser auf, spült sie in eine Kochflasche und leitet in die meist trübe Flüssigkeit einige Minuten lang Kohlensäure ein, um etwa beim Schmelzen gebildetes ätzendes Alkali in kohlen-

[1] 2 Tropfen einer 10%igen Kaliumchromatlösung (= 0·01 g K_2CrO_4) färben ½ Liter Wasser noch intensiv gelb; 50 cm^3 dieser Lösung enthalten 1 Milligramm K_2CrO_4, das also in dieser starken Verdünnung an der Gelbfärbung seiner Lösung noch sicher erkannt wird.

saures Salz überzuführen und etwa gelöstes Blei vollständig auszufällen. Alsdann erhitzt man die Flüssigkeit zum Sieden, läßt absitzen, bringt den Bodensatz[1]), der aus Baryumkarbonat, basischem Bleikarbonat, sowie metallischem Silber — in letzterem Falle ist der Bodensatz grau gefärbt — bestehen kann, auf ein Filterchen, spült ihn mit heißem Wasser aus und löst ihn auf dem Filter durch wiederholtes Aufgießen von heißer, mäßig verdünnter Salpetersäure.[2]) Die salpetersaure Lösung dampft man in einem Porzellanschälchen zur Trockne ein, löst den Rückstand in Wasser auf, fällt etwa vorhandenes Silber kochend heiß mit verdünnter Salzsäure und Blei aus der von Silberchlorid abfiltrierten Flüssigkeit mit Schwefelwasserstoff aus. Im Filtrate vom Bleisulfidniederschlage oder in der mit Schwefelwasserstoff klar gebliebenen Flüssigkeit wird das Baryum, nachdem der Schwefelwasserstoff weggekocht und die Flüssigkeit durch Filtration geklärt ist, mit verdünnter Schwefelsäure ausgefällt.

Man führe mit den erhaltenen Niederschlägen die folgenden Identitätsreaktionen aus:

Zum weiteren Nachweise des Silbers schmilzt man den mit Salzsäure erhaltenen und getrockneten Niederschlag in einen Porzellantiegel mit wenig Cyankalium zusammen und zieht die erkaltete Schmelze mit heißem Wasser aus, wobei metallisches Silber ungelöst bleibt.

Der mit Schwefelwasserstoff erhaltene Niederschlag, der aus Schwefelblei bestehen kann, wird in heißer Salpetersäure gelöst, die Lösung zur Trockne verdampft und die wässerige, filtrierte Lösung des Rückstandes mit Schwefelsäure und mit Kaliumchromat auf Blei geprüft.

Zum weiteren Nachweise des Baryums wird der mit Schwefelsäure erhaltene, auf einem Filterchen gesammelte und gut ausgewaschene Niederschlag an einem Platindraht in der nicht leuchtenden Bunsenflamme erhitzt; ist der fragliche Niederschlag baryumhaltig, so färbt sich die Flamme intensiv grün; um jede Verwechslung auszuschließen, untersuche man die grüne Flamme noch spektralanalytisch.

Bei toxikologischen Untersuchungen führe man stets derartige Identitätsreaktionen aus, um jeden Irrtum auszuschließen.

Systematischer Gang der chemischen Untersuchung auf Gifte.

Übersicht der Gruppe I.

Vor der Destillation untersuche man einen kleineren Teil des in Frage kommenden Untersuchungsmaterials mit Hilfe der *Scherer*schen Probe auf Phosphor und einen zweiten Teil mittelst der *Schönbein*schen Probe auf Blausäure.

---

[1]) Ein solcher Bodensatz wird fast immer erhalten, auch wenn Baryum, Blei und Silber nicht vorhanden sind; er besteht dann meist aus Teilen des Porzellantiegels, dessen Glasur durch den Schmelzprozeß teilweise aufgeschlossen wird.

[2]) Man verwende 5—6 cm^3 einer aus 1 Vol. konzentrierter Salpetersäure und 2 Vol. Wasser hergestellten Säure.

Ist die Vorprobe auf Phosphor positiv ausgefallen, so destilliert man im *Mitscherlich*schen Apparat, andernfalls in der üblichen Weise mit schief gestelltem *Liebig*schen Kühler. In beiden Fällen wird das möglichst zerkleinerte Untersuchungsmaterial mit Wasser zu einem Brei angerührt, mit Weinsäure angesäuert und dann in einem geräumigen Glaskolben der Destillation unterworfen. Das Destillat wird zweckmäßigerweise in zwei oder drei Fraktionen aufgesammelt. Die zuerst übergegangenen 5 bis 10 cm^3 Destillat werden auf Blausäure, Chloroform, Alkohol und eventuell auch auf Jodoform und Nitrobenzol geprüft. Die weiteren Fraktionen, welche die weniger flüchtigen Stoffe enthalten können, dienen vorzugsweise zur Prüfung auf einen Gehalt an Carbolsäure und an anderen mit Wasserdämpfen flüchtigen Phenolen, wie Lysol, ferner an Chloralhydrat, Anilin und Schwefelkohlenstoff.

Phosphor: Leuchten im *Mitscherlich*schen Apparate während der Destillation im verdunkelten Zimmer: Destillat liefert beim Eindampfen mit starkem Chlorwasser oder wenig rauchender Salpetersäure Phosphorsäure, die mit Molybdatreagens oder mit Magnesiamischung als solche erkannt wird. — Oder man prüfe das ursprüngliche Untersuchungsmaterial nach dem Verfahren von *Blondlot-Dusart* auf einen Gehalt an Phosphor.

Blausäure: Geruch. — Vorprobe: Destillat färbt einen zuerst mit Guajakharztinktur, dann mit sehr wenig Kupfersulfatlösung befeuchteten Papierstreifen blau. — Berlinerblauprobe. — Rhodanprobe. — Mit Silbernitrat: weißes, flockiges Silbercyanid.

Carbolsäure: Geruch. — Mit „Millon" beim Erwärmen Rotfärbung. — Bromwasser fällt gelblichweißes, kristallinisches Tribromphenolbrom. — Eisenchlorid färbt violett: beim Ansäuern mit Mineralsäure geht das Violett in Gelb über.

Chloroform: Geruch. — Beim Erhitzen mit wenig Anilin und Kalilauge tritt der widerliche Geruch des Phenylisonitrils auf. — Beim Erhitzen mit Resorcin und Kalilauge Rotfärbung. — Bei gelindem Erwärmen mit α-Naphthol und Kalilauge Blaufärbung. — Chloroformhaltiges Destillat reduziert beim Erwärmen ammoniakalische Silbernitratlösung sowie die „Fehlingsche Lösung".

Chloralhydrat: Gibt die Reaktionen des Chloroforms. — Mit „Neßler" ziegelroter, nach einiger Zeit gelb oder schmutziggrün werdender Niederschlag. — Beim Erhitzen mit Magnesiumoxyd und Wasser entstehen Chloroform und ameisensaures Magnesium: Nachweis der Ameisensäure durch Erwärmen mit Silbernitrat und mit Quecksilberchlorid.

Jodoform: Geruch. — Destillat trübe, weißlich: der Ätherauszug des Destillats hinterläßt beim Eindunsten Jodoformkristalle. — Das jodoformhaltige Destillat gibt die Reaktionen des Chloroforms.

Anilin: Mit Chlorkalklösung Violettfärbung. — Beim Erhitzen mit 1 oder 2 Tröpfchen Chloroform und Kalilauge tritt der widerliche Geruch des Phenylisonitrils auf. — Bromwasser verursacht eine fleischrote Fällung. —

Beim Erwärmen mit „Millon" Rotfärbung und Entwicklung von Stickstoff.

Schwefelkohlenstoff: Beim Erhitzen mit wenig Bleiacetat und Kalilauge schwarze Färbung oder schwarzer Niederschlag (PbS). — Beim Eindampfen mit konzentriertem Ammoniak entsteht Rhodanammonium, das nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure mit wenig Eisenchlorid nachgewiesen wird. — Beim Schütteln mit alkoholischer Kalilauge entsteht xanthogensaures Kalium, das mit Hilfe von Kupfersulfatlösung erkannt wird.

Äthylalkohol: Gibt bei gelindem Erwärmen mit Jod und Alkalilauge Jodoform. — Beim tüchtigen Schütteln mit Benzoylchlorid und Natronlauge tritt der Geruch des Benzoesäureäthylesters auf. Beim Erwärmen mit einer Spur Kaliumdichromat und Salzsäure Grünfärbung und Auftreten des Acetaldehydgeruchs. — Beim Erwärmen mit wenig Natriumacetat und mit konzentrierter Schwefelsäure macht sich der Geruch des Essigsäureäthylesters bemerkbar.

Übersicht der Gruppe II.

Die Untersuchung auf organische Giftstoffe, die aus saurer Lösung mit Wasser nicht flüchtig sind, nach dem Verfahren von *Stas-Otto*.

Alkaloide, Glukoside, künstliche organische Arzneistoffe.

A. Der Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges der wässerigen-weinsauren Lösung kann enthalten:

Pikrotoxin: Stark bitter. — „Fehling" wird beim Erwärmen reduziert. — Mit alkoholischer Benzaldehydlösung und mit konzentrierter Schwefelsäure übergossen, fließen von Pikrotoxin rote Streifen ab (*Melzer*sche Probe). Konzentrierte Schwefelsäure löst mit gelber oder orangeroter Farbe; läßt man ein Tröpfchen Kaliumdichromatlösung hineinfallen, so umgibt sich dieses mit einem braunen Rand. — Durchfeuchtet man ein Gemisch aus Pikrotoxin und etwa der dreifachen Menge Salpeter mit einer Spur konzentrierter Schwefelsäure, so färbt es sich mit überschüssiger gesättigter Natronlauge rot.

Colchicin[1]: Stark bitter, gelblich, amorph. — Die wässerigen Colchicinlösungen färben sich mit einigen Tröpfchen einer Mineralsäure intensiv gelb. — Konzentrierte Salpetersäure löst mit schmutzig violetter, alsbald in Braunrot und schließlich in Gelb übergehender Farbe: fügt man jetzt überschüssige Kalilauge hinzu, so färbt sich das Gemisch orangegelb oder orangerot. *Zeisels* Colchicinprobe: Kocht man in einem Probier-

[1]) Infolge der geringen Löslichkeit in Äther findet sich Colchicin nur in geringer Menge im Ätherauszuge der weinsauren Lösung vor. Bei weitem die größte Menge des Colchicins ist im Chloroformauszuge der mit Ammoniak alkalisch gemachten Flüssigkeit enthalten.

röhrchen die stark gelb gefärbte Lösung des Colchicins in konzentrierter Salzsäure mit 2 Tröpfchen Eisenchloridlösung 2—3 Minuten, so nimmt sie nach dem Erkalten, besonders nach Zusatz von etwa der gleichen Menge Wasser, eine grüne oder mehr olivgrüne Färbung an.

Cantharidin: Bleibt beim Eindunsten seiner Ätherlösung in rhombischen Blättchen zurück. — In Ermanglung von charakteristischen chemischen Reaktionen führe man den physiologischen Nachweis; zu dem Zweck verreibe man den fraglichen Rückstand mit einigen Tropfen Mandelöl und prüfe das Gemisch durch Einreiben auf den Oberarm auf eine etwaige blasenziehende Wirkung.

Pikrinsäure: Stark bitter, gelb, bleibt aus der Ätherlösung meist amorph zurück. Untersuchungsmaterial und die verschiedenen Auszüge sind bei Vorhandensein von Pikrinsäure mehr oder weniger intensiv gelb gefärbt. — Eine wässerige Pikrinsäurelösung färbt sich bei gelindem Erwärmen mit einigen Tröpfchen gesättigter Cyankaliumlösung rot (Isopurpursäurereaktion). In gleicher Weise färbt sich eine wässerige Pikrinsäurelösung beim Erwärmen mit wenig Schwefelammonium rot. — Eine wässerige Pikrinsäurelösung färbt Wolle und Seide gelb, nicht aber Baumwolle.

Salicylsäure: Meist Kristallnädelchen von süßlich-saurem, etwas kratzendem Geschmack. — Die wässerige Lösung färbt sich mit einem Tröpfchen Eisenchloridlösung blauviolett, in stärkerer Verdünnung rotviolett. — Beim Erwärmen mit „Millon" Rotfärbung. — Überschüssiges Bromwasser fällt einen gelblichweißen, kristallinischen Niederschlag.

Acetanilid: Von schwach brennendem Geschmack. — Kocht man Acetanilid mit einigen Kubikzentimetern konzentrierter Salzsäure auf etwa 20 Tröpfchen ein, fügt nach dem Erkalten wässerige Phenollösung sowie tropfenweise Chlorkalklösung hinzu, so färbt sich das Gemisch beim Umschütteln schmutzigrot bis violett und beim Überschichten mit Ammoniak tiefblau. — Kocht man Acetanilid erst für sich mit alkoholischer Kalilauge, dann nochmals nach Zusatz von wenig Chloroform, so tritt der widerliche Geruch des Phenylisonitrils auf.

Phenacetin: Geschmacklos. — Gibt die Indophenol-, aber nicht die Isonitrilprobe. — Konzentrierte Salpetersäure färbt Phenacetin gelb und löst es mit gelber bis orangeroter Farbe. — Gibt beim Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure gelbe oder orangegelbe Lösungen; falls diese Lösungen gesättigt sind, kristallisiert beim Erkalten gelbes Nitrophenacetin aus.

Veronal: Bitter, kristallisiert gut. Man löse den Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges in möglichst wenig wässeriger Natronlauge oder wässerigem Ammoniak, filtriere und säure das Filtrat mit verdünnter Salzsäure an; Veronal kristallisiert aus; man bestimme den Schmelzpunkt der trockenen Kristalle (187—188°) und auch denjenigen eines Gemisches der fraglichen Kristalle mit absolut reinem Veronal; der Schmelzpunkt muß der gleiche bleiben.

Antipyrin[1]): Von milde bitterem Geschmack. — Man prüfe die wässerige Lösung des Verdunstungsrückstandes auf Antipyrin: mit einem Tröpfchen Eisenchlorid Rotfärbung. — Mit 1—2 Tröpfchen rauchender Salpetersäure Grünfärbung; kocht man auf und fügt alsdann einen weiteren Tropfen rauchender Salpetersäure hinzu, so geht das Grün in Rot über.

Coffein[2]): Schwach bitter. — Coffein hinterläßt beim Verdampfen mit gesättigtem Chlorwasser auf dem Wasserbade einen rotbraunen Rückstand, der sich beim Befeuchten mit sehr wenig Ammoniak purpurviolett färbt. Zweckmäßigerweise kocht man nach *E. Fischer* die zu prüfende Substanz in einem Reagenzgläschen mit starkem Chlorwasser oder mit Salzsäure und einer Spur chlorsaurem Kalium, verdampft dann im Schälchen auf dem Wasserbade zur Trockne und befeuchtet den Rückstand mit Ammoniak.

B. Der Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges der wässerigen, alkalisch reagierenden Flüssigkeit kann enthalten:

Coniin: Gelbe Öltröpfchen von durchdringendem Geruch. — Die kalt gesättigte wässerige Lösung des Coniins trübt sich beim Erwärmen. Beim freiwilligen Verdunstenlassen einer Spur Coniin mit einem Tropfen Salzsäure bleibt salzsaures Coniin in doppelbrechenden, nadel- oder säulenförmigen, bisweilen sternförmig gruppierten Kristallen. — Physiologischer Versuch: Lähmung der peripherischen Nerven.

Nikotin: Flüssig, bleibt in dem beim Eindunsten des Ätherauszuges verdichteten Wasser gelöst, das dann schwachen Tabakgeruch zeigt. — *Melzer*sche Probe: Beim Erhitzen mit 2—3 *cm*³ Epichlorhydrin tritt eine Rotfärbung auf. — *Schindelmeiser*sche Probe: Läßt man Nikotin mit einem Tropfen Formaldehydlösung einige Stunden stehen und fügt dann einen Tropfen Salpetersäure hinzu, so tritt eine intensive rote Färbung auf. *Roussin*sche Kristalle: Mit ätherischer Jodlösung entstehen, meist erst nach längerem Stehen, rubinrote Kristallnadeln.

Anilin: Bleibt beim Eindunsten des Ätherauszuges als rötlich oder bräunlich gefärbte Öltröpfchen zurück, die im Wasser gelöst und nach den obigen Angaben auf Anilin geprüft werden.

Veratrin: Konzentrierte Schwefelsäure löst mit gelber, allmählich in Orange, Rot und endlich in Kirschrot übergehender Färbung; gelindes Erwärmen beschleunigt diesen Farbenwechsel; die Lösung des Veratrins in konzentrierter Schwefelsäure zeigt anfänglich eine ausgesprochen grüngelbe Fluoreszenz. „Fröhde“ ruft die gleichen Farbenerscheinungen hervor. — Beim Erwärmen mit konzentrierter Salzsäure im Wasserbade tritt eine

[1]) Die größte Menge etwa vorhandenen Antipyrins findet sich im Ätherauszuge der wässerig-alkalischen Flüssigkeit (vgl. den Rückstand des Ätherauszuges B).

[2]) Coffein verhält sich wie Antipyrin; nur ein kleiner Teil geht aus weinsaurer Lösung in den Äther über; die größere Menge vorhandenen Antipyrins findet sich im Ätherauszuge B und hauptsächlich im Chloroformauszuge D vor.

beständige Rotfärbung auf. — *Weppen*sche Reaktion: Das Gemisch aus Veratrin und etwa der sechsfachen Menge Rohrzucker färbt sich mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure allmählich grün und schließlich blau. Statt des Rohrzuckers kann auch eine furfurolhaltige Schwefelsäure verwendet werden.

Strychnin: Bleibt beim Eindunsten der ätherischen Lösung häufig in sehr feinen, sehr stark bitter schmeckenden Kristallnädelchen zurück. — Die farblose Lösung des Strychnins färbt sich mit einem Stückchen Kaliumdichromat vorübergehend blau oder blauviolett. — „Mandelin" gibt die gleiche Färbung, nur ist diese beständiger als die durch Kaliumdichromat hervorgerufene Färbung.

Brucin: Konzentrierte Salpetersäure löst Brucin mit blutroter, alsbald in Rotgelb und Gelb übergehender Farbe. Versetzt man die gelb gewordene Lösung in einem Reagenzgläschen tropfenweise mit verdünnter Zinnchlorürlösung, so geht das Gelb in Violett über. Oder man schichtet die Lösung des Brucins in stark verdünnter Salpetersäure vorsichtig über konzentrierte Schwefelsäure, wobei eine rote oder rotgelbe Zone entsteht.

Atropin: Beim Verdampfen im Porzellanschälchen auf dem Wasserbade mit einigen Tropfen rauchender Salpetersäure bleibt ein gelblicher Rückstand zurück, der sich beim Befeuchten mit alkoholischer Kalilauge violett färbt. Hyoscyamin, Homatropin und Skopolamin geben ebenfalls diese Probe. Strychnin und Veratrin verhalten sich hierbei ähnlich wie Atropin. — Physiologischer Versuch mit dem Auge: Pupillenerweiterung tritt noch ein durch einen Tropfen einer Atropinlösung von der Verdünnung 1 : 130.000.

Cocain: Fällt aus seinen Salzlösungen auf Zusatz von Kalilauge in Form von alsbald fest und kristallinisch werdenden Öltröpfchen aus. — Nachweis der Benzoylgruppe: Erwärmt man Cocain mit 1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure in einem Reagenzgläschen 5 Minuten lang in einem kochenden Wasserbade und fügt dann vorsichtig 2 cm^3 Wasser hinzu, so macht sich der Geruch des Benzoesäuremethylesters bemerkbar, ferner scheidet sich beim Erkalten der Lösung Benzoesäure aus: Nachweis der letzteren durch eine Bestimmung des Schmelzpunktes (120°) und die Sublimationsfähigkeit. — Physiologischer Nachweis: Gefühllosigkeit auf der Zunge.

Codein: Konzentrierte Schwefelsäure löst Codein in der Kälte ohne Färbung; bei längerem Stehen oder sofort bei gelindem Erwärmen nimmt die Lösung eine rötliche oder mehr bläuliche Färbung an. — Beim Erwärmen von Codein mit konzentrierter Schwefelsäure und arsensaurem Kalium oder statt des letzteren mit einer Spur Eisenchloridlösung färbt sich die Lösung rein blau oder blauviolett. — „Fröhde" löst mit gelblicher, alsbald in Grün und bei gelindem Erwärmen in Blau übergehender Farbe. — Formalinschwefelsäure löst Codein mit rötlichvioletter, alsbald in ein beständiges Blauviolett übergehender Farbe. — Codein gibt die *Pellagri*sche Reaktion (vgl. Morphin).

Narkotin: Reagiert nicht alkalisch (Unterschied von anderen Alkaloiden) und schmeckt nicht bitter. — Fröhde löst mit grüner Farbe. — Nimmt man konzentriertes *Fröhde*sches Reagens (0·05 *g* Ammoniummolybdat + 1 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure), so geht die anfangs grünliche Färbung allmählich in ein schönes Kirschrot und vom Rande her in Blau über. — „Erdmann“ löst mit schön roter Farbe.

Hydrastin: „Fröhde“ löst mit ziemlich beständiger grüner Farbe, die später in Braun übergeht. — „Mandelin“ löst mit roter, allmählich in Orangerot übergehender Farbe. — Schüttelt man die Lösung des Hydrastins in verdünnter Schwefelsäure mit stark verdünnter Kaliumpermanganatlösung, so fluoresziert sie intensiv blau. Man setze die Permanganatlösung tropfenweise zu.

Chinin: Verdunstungsrückstand der Ätherlösung bildet meist einen amorphen, stark bitter schmeckenden Firnis. — Die Lösung des Chinins in verdünnter Schwefelsäure fluoresziert blau. — Thalleiochinprobe: Man versetze die Lösung des Verdunstungsrückstandes in verdünnter Essigsäure erst mit ca. 1 *cm*³ starkem Chlorwasser, dann sofort tropfenweise mit Ammoniak im Überschusse: bei Vorhandensein von Chinin tritt jetzt eine smaragdgrüne Färbung auf. — Herapathitprobe: Man löse den Verdunstungsrückstand der Ätherlösung in etwa 10 Tropfen einer Mischung aus 30 Tropfen Essigsäure, 20 Tropfen absolutem Alkohol und 1 Tropfen verdünnter Schwefelsäure, erhitze zum Sieden und füge 1 Tropfen alkoholischer Jodlösung (1:10) hinzu. Ist Chinin vorhanden, so scheiden sich olivengrüne, im reflektierten Licht cantharidengrün erscheinende, glänzende Blättchen aus.

Pyramidon: Hinterbleibt aus seiner Ätherlösung häufig in feinen Nädelchen, leicht löslich in Wasser und von neutraler Reaktion. Man löst den fraglichen Rückstand aus der Ätherlösung ein wenig: Eisenchlorid färbt die Lösung blauviolett oder mehr rotviolett und rauchende Salpetersäure färbt sie blau bis blauviolett, wenn Pyramidon zugegen ist.

Antipyrin und Coffein weise man mit Hilfe der unter A angegebenen Reaktionen nach.

Physostigmin: Gibt beim Eindampfen mit Ammoniak einen blauen, in Alkohol mit blauer Farbe löslichen Rückstand. — Physiologischer Versuch: Pupillenverkleinerung.

C. Der Verdunstungsrückstand des Ätherauszuges der mit Ammoniak alkalisch gemachten Flüssigkeit kann enthalten:

Apomorphin: Der Verdunstungsrückstand ist amorph, meist grünlich gefärbt. — Die Lösung in wenig konzentrierter Schwefelsäure färbt sich mit einem Tropfen konzentrierter Salpetersäure vorübergehend violett, dann rotgelb oder orangefarben. — „Fröhde“ löst mit grüner oder violetter Farbe. — Versetzt man die Lösung des Apomorphins in verdünnter Salzsäure erst mit überschüssigem Natriumbikarbonat, dann unter tüchtigem Umschütteln mit 1—2 Tröpfchen alkoholischer Jodlösung, so färbt sie sich

blaugrün oder smaragdgrün und Äther, der damit geschüttelt wird, nimmt eine violette Färbung an. — *Wangerin*sche Probe: Schüttelt man eine Lösung von salzsaurem Apomorphin mit 1—2 Tropfen Kaliumdichromatlösung (0·3% $K_2Cr_2O_7$), so färbt sie sich allmählich dunkelgrün und zersetztes Chloroform färbt sich violett: auf vorsichtigen Zusatz von verdünntem Zinnchlorür nimmt das Chloroform eine rein indigoblaue Färbung an.

D. Der Verdunstungsrückstand des Chloroformauszuges der durch Ammoniak alkalisch gemachten wässerigen Flüssigkeit kann enthalten:

Morphin: Stark bitter, bleibt aus der Chloroformlösung meist amorph, selten kristallinisch zurück. — „Fröhde" löst mit violetter, allmählich in ein schmutziges Grün und schließlich in ein schwaches Rot übergehender Farbe. — Formalinschwefelsäure löst mit purpurroter, später blauviolett und fast rein blau werdender Farbe. — *Husemann*sche Probe: Erhitzt man die Lösung des Morphins in konzentrierter Schwefelsäure über ganz kleiner Flamme so stark, daß reichlich Schwefelsäuredämpfe auftreten, und läßt nach dem Erkalten 1 Tröpfchen konzentrierte Salpetersäure zufließen, so tritt vorübergehend eine rotviolette Färbung auf, die alsbald in Blutrot oder Rotgelb übergeht. — *Pellagris* Probe. — Eisenchloridprobe: Man löse nicht zu wenig des fraglichen Rückstandes aus der Chloroformlösung in einigen Tröpfchen stark verdünnter Salzsäure, dampfe die Lösung auf dem Wasserbade zur Trockne ein, löse den Rückstand in wenig Wasser und füge ein Tröpfchen Eisenchloridlösung hinzu; eine auftretende Blaufärbung zeigt dann Morphin an.

Narcein: Jodwasser färbt blau. — Beim Erwärmen der intensiv gelbgefärbten Lösung in Resorcinschwefelsäure auf dem Wasserbade unter Umrühren tritt eine karminrote, manchmal auch mehr kirschrote Färbung auf. — Die gelbbraune Lösung des Narceins in Tanninschwefelsäure färbt sich beim Erwärmen auf dem Wasserbade rein grün.

Colchicin: Bleibt als gelber oder mehr bräunlichgelber Firnis zurück, der die für Colchicin angegebenen Reaktionen zeigt (vgl. A).

Antipyrin und Coffein: Diese beiden, in Äther verhältnismäßig schwer, in Chloroform aber leicht löslichen Stoffe finden sich häufig, falls sie zugegen sind, auch im Rückstande des Chloroformauszuges D vor und können dann durch die früher unter A angegebenen Reaktionen erkannt werden.

Übersicht der Gruppe III.

Der Destillationsrückstand, der nach dem Abdestillieren der flüchtigen Gifte (Gruppe I) bleibt, oder ein Teil des ursprünglichen Untersuchungsmaterials wird in einem Glaskolben oder einer Porzellanschale mit verdünnter Salzsäure (von 10—12% HCl) angerührt und unter Zugabe von chlorsaurem Kalium in Substanz oder in konzentrierter wässeriger Lösung unter häufigem Umrühren auf einem kochenden Wasserbade so lange erhitzt, bis der größte Teil des Untersuchungsobjektes in

Lösung gegangen ist und die Flüssigkeit selbst eine gelbe Farbe angenommen hat: nun wird mit Wasser verdünnt, mit einigen Tropfen Schwefelsäure versetzt und abfiltriert. Falls das Filtrat viel freie Säure enthält, wird der Überschuß derselben größtenteils verdampft.

Filtrat:
Es wird unter Erwärmen auf dem Wasserbade längere Zeit, 1—2 Stunden, mit Schwefelwasserstoffgas gesättigt; nach dem Stehenlassen in einer nur lose verschlossenen Flasche bis zum anderen Tage wird abfiltriert.

Filterrückstand:
Ag, Pb, Ba.

Niederschlag:
wird auf dem Filter mit einem heißen Ammoniak-Schwefelammoniumgemisch wiederholt übergossen.

Filtrat:
Cr, Zn.

Filtrat:
As, Sb, Sn, Cu.

Filterrückstand:
Hg, Pb, Cu, Bi, Cd.

IV. Die Untersuchung auf solche Giftstoffe, die sich nicht in die drei Hauptgruppen von Giften einreihen lassen.

Die Mineralsäuren.

Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure.

Leichenteile werden im allgemeinen nur dann auf Mineralsäuren untersucht, wenn der Sektionsbefund der Leiche auf eine Vergiftung durch eine stärkere Säure schließen läßt, wenn also charakteristische Ätzungen und Verfärbungen von Gesicht, Mund, Speiseröhre und Magen vorhanden sind. Da Chlormetalle, salpetersaure und schwefelsaure Salze normale Bestandteile fast aller tierischer Stoffe und Flüssigkeiten sind, muß bei derartigen Untersuchungen der Nachweis geführt werden, daß eine freie Mineralsäure zugegen ist.

Zur Untersuchung auf freie Mineralsäuren zieht man das fragliche Untersuchungsobjekt mit kaltem Wasser aus, filtriert ab und stellt mit dem Filtrat, falls es stark sauer reagiert, die folgenden Versuche an:

1. Man versetzt das Filtrat mit wenigen Tropfen einer wässerigen (0·1 : 1000) oder einer alkoholischen Lösung (1 : 100) von Methylviolett; nur bei Gegenwart einer freien Mineralsäure färbt sich das Filtrat blau oder grün.

2. Man fügt zum Filtrat einige Tropfen einer verdünnten, wässerigen Lösung von Methylorange; eine auftretende Rotfärbung zeigt dann freie Mineralsäure an.

3. „Kongopapier“ färbt sich selbst mit sehr stark verdünnten Mineralsäuren blau.

4. Man verdampft in einem Porzellanschälchen einige Tropfen des Filtrats mit 3—4 Tropfen *Günzburg*schem Reagens[1]) auf dem Wasserbade oder über kleiner Flamme vollständig zur Trockne; bei Gegenwart von freier Salzsäure oder Schwefelsäure ist der Verdampfungsrückstand schön rot oder rotgelb gefärbt. Freie Salpetersäure liefert einen mehr gelbroten Rückstand.

Hat man in einem Untersuchungsobjekt freie Mineralsäure nachgewiesen, so ist noch der Nachweis der betreffenden Säure selbst zu führen.

Salzsäure.

1. Erwärmt man eine Probe des wässerigen, nicht zu verdünnten Auszuges des Untersuchungsmateriales mit fein gepulvertem Braunstein, so wird bei Gegenwart von freier Salzsäure Chlor frei, das an der Farbe, am Geruch und durch Einleiten in eine Jodkaliumlösung an der Ausscheidung von Jod erkannt wird. Diese Reaktion ist nicht ganz eindeutig für freie Salzsäure, denn bei gleichzeitigem Vorhandensein von freier Schwefelsäure und einem Chlormetall erhält man unter denselben Bedingungen ebenfalls Chlor.

2. Wenn es irgendwie möglich ist, wird man die Salzsäure abzudestillieren und im Destillate nachzuweisen suchen.

Bei der Destillation der Salzsäure hat man besonders die Konzentration der Säure zu berücksichtigen; von einer sehr verdünnten Salzsäure geht zunächst nur Wasser über; erst wenn die Säure eine Stärke von etwa 10% HCl erreicht hat, destilliert auch Chlorwasserstoff mit über.[2]) Da bei den meisten derartigen Untersuchungen eine verdünntere Salzsäure vorliegen dürfte, hat man demnach das mit Wasser angerührte Untersuchungsobjekt, oder besser den wässerigen, filtrierten Auszug desselben fast bis zur Trockne abzudestillieren. Dies geht am besten in der Weise, daß man die Destillation in einem Ölbade vornimmt. Im Destillate weist man die Salzsäure mit Silbernitrat bei Gegenwart von verdünnter Salpetersäure nach. Häufig ist es geboten, die freie Salzsäure quantitativ zu bestimmen; ist keine andere freie Säure im Destillate vorhanden, so geschieht dies durch Titration mit $^1/_{10}$ Normalkalilauge unter Anwendung von Phenolphtalein als Indikator. Andernfalls bestimmt man die Säure entweder gewichtsanalytisch durch Ausfällen mit Silbernitrat und Wägen des entstandenen Silberchlorids oder maßanalytisch nach der *Volhard*schen Restmethode. Da im Mageninhalt des Menschen normalerweise freie Salzsäure in einer Menge von 0·1—0·6% vorhanden ist, muß die bei der Untersuchung eines Mageninhaltes ge-

[1]) Vgl. „Die Bereitung der Reagenzien", Seite 813.

[2]) Destilliert man z. B. 100 cm^3 1%iger Salzsäure, so enthalten die ersten 90 cm^3 Destillat nur Spuren von Salzsäure; fast alle Säure findet sich in dem letzten Destillate vor.

fundene freie Salzsäure stets quantitativ bestimmt werden. Nur wenn eine größere Menge freier Salzsäure gefunden wird, ist die Annahme einer Salzsäurevergiftung zulässig.

Salpetersäure.

Im Organismus des Menschen finden sich salpetersaure Salze normalerweise nur in sehr geringer Menge vor, und zwar stammen dieselben meist aus dem Trinkwasser und aus den pflanzlichen Nahrungsmitteln. Auch der Harn des Menschen enthält normalerweise höchstens Spuren von salpetersauren und salpetrigsauren Salzen. Leichenteile pflegt man nur dann auf Salpetersäure zu prüfen, wenn der anatomische Befund bei der Leichenöffnung auf eine Vergiftung durch diese Mineralsäure schließen läßt, wenn also besonders Lippen, Mund, Speiseröhre und Magen gelb oder gelbbraun verfärbt sind und mehr oder weniger starke Ätzungen, unter Umständen Perforationen zeigen. Aus Mund und Nase der Leiche soll ein gelber Schaum ausfließen. Auch der Mageninhalt kann bei Vergiftung durch eine konzentriertere Salpetersäure eine gelbe Färbung zeigen. Falls die Salpetersäure verdünnter als 20%ig ist, können die spezifischen Veränderungen des Magendarmkanales fehlen. Bei innerlicher Darreichung von Salpetersäure, und zwar gleichgültig, ob verdünnte oder konzentrierte Säure dem Organismus zugeführt wird, läßt sie sich alsbald im Harn nachweisen.

Nachweis der Salpetersäure.

1. Destillation. In manchen Fällen wird man das fragliche Untersuchungsobjekt direkt mit Wasser ausziehen und den abfiltrierten Auszug in der üblichen Weise auf Salpetersäure prüfen können. Liegen voraussichtlich mehr als Spuren der Säure vor, so kann man versuchen, die Salpetersäure aus dem wässerigen, abfiltrierten Auszuge abzudestillieren, und zwar führt man die Destillation zweckmäßig in einem Ölbade aus. Hierbei ist zu beachten, daß Salpetersäure, ähnlich wie die Salzsäure, erst von einer bestimmten Konzentration an[1], mit den Wasserdämpfen überdestilliert: man muß also den abfiltrierten Auszug fast zur Trockne abdestillieren. Hierbei geht freilich ein großer Teil der Salpetersäure verloren: ein Teil wird von den organischen Substanzen, besonders den Eiweißstoffen, gebunden (Bildung von Xanthoproteinsäure, Nitroderivaten etc.) oder zu Oxydationen verbraucht, so daß auf jeden Fall nicht die gesamte, ursprünglich vorhanden gewesene Salpetersäure im Destillate wiedergefunden wird. Gegen das Ende der Destillation treten braune Dämpfe von Stickstoffdioxyd auf: ein solches Destillat färbt sich daher mit einem farblosen Gemisch aus stark verdünnter Schwefelsäure, Jod-

[1]) Unterwirft man einen dünnen Brei aus zerstoßenem Hundekuchen und 100 cm^3 1%iger Salpetersäure der Destillation, so findet sich bei weitem die größte Menge der Säure in den letzten 10 cm^3 Destillat vor.

kalium- und Stärkelösung blau. Der im Destillationsgefäß bleibende Rückstand ist bei Vorhandensein von Salpetersäure meist mehr oder weniger gelb verfärbt.

Im erhaltenen Destillate sucht man die Salpetersäure durch die unten verzeichneten Proben nachzuweisen.

2. Nachweis der Salpetersäure nach *C. Fleury*.[1] Man zieht das fein zerkleinerte Untersuchungsmaterial, wie Organteile, mit absolutem Alkohol aus, filtriert, versetzt das Filtrat mit gelöschtem Kalk im Überschuß, läßt 12 Stunden stehen, um etwa gebildeten Salpetersäureester zu zersetzen, filtriert, dampft das Filtrat zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in Alkohol von 95% auf, verjagt den Alkohol aus der abfiltrierten Lösung und prüft schließlich die wässerige Lösung des Rückstandes auf Salpetersäure. *Fleury* hat nach diesem Verfahren in Organteilen etwa den fünften Teil der Salpetersäure wiedergefunden. Nach dieser Methode wird die Salpetersäure in ihr Calciumsalz übergeführt, das in Alkohol löslich ist. Aber auch Natriumnitrat ist in Alkohol von 95% in erheblicher Menge, nämlich etwa 1 : 50 löslich. Erhält man daher schließlich mit dem Rückstand eine schwache Salpetersäureprobe, so beweist diese noch nicht, daß freie Salpetersäure im Untersuchungsmaterial vorhanden war. Diesen Fehler vermeidet das

3. Verfahren von *Baumert*[2], nach welchem das Untersuchungsobjekt direkt oder aber sein wässeriger Auszug mit Kalkmilch neutralisiert, zur Trockne gebracht und mit Alkohol ausgekocht wird. Oder man dampft nach der Neutralisation mit Kalkmilch oder Calciumkarbonat zum Sirup ein und vermischt diesen unter Umrühren mit Alkohol. Der auf die eine oder andere Weise erhaltene und filtrierte alkoholische Auszug wird abdestilliert, der Destillationsrückstand mit Wasser durchgerührt, das Filtrat eingedampft, das Zurückbleibende abermals in Alkohol gelöst und diese Lösung mit etwa dem gleichen Volumen Äther in verschlossener Flasche einige Stunden stehen gelassen. Der Verdampfungsrückstand der filtrierten Alkoholätherlösung wird in wenig Wasser gelöst und die Lösung in der folgenden Weise auf Salpetersäure geprüft:

1. Mit Diphenylaminschwefelsäure: Blaufärbung.

Man kann diese Probe als Zonenprobe ausführen, indem man die mit einigen Tropfen Diphenylaminsulfatlösung[3] vermischte fragliche Flüssigkeit, wässeriger Auszug oder Destillat, über salpetersäurefreie konzentrierte Schwefelsäure schichtet; bei Vorhandensein von Salpetersäure entsteht an den Berührungsflächen der beiden Flüssigkeitsschichten eine blaue Zone.

2. Mit Brucin-Schwefelsäure: Rotfärbung. Auch diese Probe kann als Zonenprobe angeführt werden, indem man die fragliche Flüssig-

[1] Ann. Chem. analyt. appl. 6. 12.

[2] *Baumert*, Lehrbuch der gerichtlichen Chemie. II. Aufl. 1907.

[3] 1 *g* Diphenylamin + 5 *g* verdünnte Schwefelsäure + 100 *g* Wasser.

keit mit etwa dem gleichen Volumen Brucinsulfatlösung[1]) mischt und dieses Gemisch vorsichtig über reine konzentrierte Schwefelsäure schichtet; eine rote Zone zeigt dann Salpetersäure an.

3. Man vermischt die auf Salpetersäure zu prüfende Flüssigkeit mit gesättigter Ferrosulfatlösung und schichtet das Gemisch über konzentrierte Schwefelsäure. Eine braune Zone zeigt Salpetersäure an.

4. Besonders charakteristisch für freie Salpetersäure ist ihr Verhalten zu Kupferblech, mit dem sie beim Erhitzen die rotbraunen Dämpfe von Stickstoffdioxyd gibt.

Schwefelsäure.

Da fast alle tierischen und pflanzlichen Substanzen normalerweise schwefelsaure Salze enthalten, muß bei der Untersuchung von derartigem Material selbstverständlich nachgewiesen werden, daß freie Schwefelsäure vorhanden ist. Organteile einer Leiche werden nur dann auf einen Gehalt an freier Schwefelsäure untersucht, wenn der Sektionsbefund auf eine Vergiftung mit dieser Säure schließen läßt, wenn also Lippen, Mund, Speiseröhre und Magen starke Ätzungen und Verfärbungen erkennen lassen. An den Lippen finden sich Schorfe; die Schleimhaut des Mundes ist weißgrau verfärbt; vom Zungenrücken kann sich die weiße Decke bereits losgelöst haben und darunter das bräunlich gefärbte, harte Muskelgewebe erkennen lassen. Die Zunge sieht manchmal wie gekocht aus. Die Speiseröhrenschleimhaut ist stark gefaltet und grau belegt. Der Magen ist meist schon von außen braun oder schiefergrau verfärbt und der Mageninhalt schwärzlich. Sehr häufig kommt es bei Schwefelsäurevergiftung zur Perforation der Magenwand und zum Austritt braunschwarzer Massen in die Bauchhöhle. Im Magen können sich schwarze Flecken vorfinden, die nach *R. Kobert* (Intoxikation) nicht von einer Verkohlung, wie man früher vielfach annahm, sondern von braunschwarzem Hämatin herrühren. In der Tat wird der Blutfarbstoff Oxyhämoglobin durch Säuren wie auch durch Erwärmen in Globulin und Hämatin zerlegt; auch Methämoglobin und Hämatoporphyrin können gebildet werden. Das letztere entsteht aus dem Hämatin bei der Einwirkung von Säuren, und zwar unter Austritt des Eisens; alle drei Umwandlungsprodukte des roten Blutfarbstoffes, also das Methämoglobin, Hämatin und Hämatoporphyrin können bei Schwefelsäurevergiftung gebildet werden und sich dann auch im Harn vorfinden. Das Blut in den Magenwandungen reagiert oft sauer und enthält dann hauptsächlich Methämoglobin und

[1]) 1 *g* Brucin + 5 *g* verdünnte Schwefelsäure + 100 *g* Wasser. Die für die beiden Salpetersäureproben notwendige Schwefelsäure darf diese Proben für sich allein nicht geben. Anderenfalls muß man die betreffende Schwefelsäure in einer Platinschale so lange kochen, bis die nitrose Säure verjagt ist, oder die Säure aus einer kleinen Retorte abdestillieren, wobei der die Salpetersäure und salpetrige Säure enthaltende Vorlauf entfernt wird.

Hämatin. Auch im Darm kann die Schleimhaut bis tief abwärts weißgrau verfärbt und ihre Reaktion stark sauer sein.

Nachweis der Schwefelsäure.

1. Man zieht das fragliche, fein zerkleinerte Untersuchungsmaterial, falls es stark sauer reagiert, mit kalten absolutem Alkohol aus, wobei die freie Schwefelsäure, nicht aber etwa vorhandene schwefelsaure Salze, in Lösung geht und filtriert nach einigem Stehen ab. Das Filtrat dunstet man auf dem Wasserbade ein, oder, wenn größere Mengen vorliegen, destilliert man den Alkohol ab, versetzt den Rückstand mit 10 cm^3 Wasser, kocht auf, um etwa gebildete Äthylschwefelsäure zu zerlegen und weist dann die Schwefelsäure in der abfiltrierten Lösung mit Baryumchlorid und mit Bleiacetat nach. Die hierbei erhaltenen Niederschläge sucht man mit Hilfe der Heparreaktion weiterhin als Sulfatniederschläge zu charakterisieren.

2. Man zieht das zerkleinerte Untersuchungsmaterial mit Wasser aus und untersucht die abfiltrierte Flüssigkeit in der folgenden Weise auf freie Schwefelsäure:

a) Man dunstet eine Probe desselben in einem Porzellanschälchen über einem Stückchen Zucker auf dem Wasserbade ein; bei Vorhandensein von freier Schwefelsäure hinterbleibt ein brauner oder schwarzer, kohliger Rückstand.

b) Man dampft das erhaltene Filtrat erst auf dem Wasserbade auf ein kleineres Volumen ein und erhitzt es dann in einem Probierröhrchen mit einem Stückchen Kupferblech; enthält das Filtrat freie Schwefelsäure, so wird Schwefeldioxyd gebildet, das an seinem stechenden Geruche erkannt wird. Man kann das entstandene Schwefeldioxyd auch abdestillieren und zwar zweckmäßig in einer Kohlensäureatmosphäre, und es im Destillate in der folgenden Weise nachzuweisen suchen.

Beim Erwärmen mit wenig Zinnchlorürlösung wird gelbes Zinnsulfid gefällt.

Tropfenweise mit Jod-Jodkaliumlösung versetzt, tritt Entfärbung ein und gleichzeitig entsteht Schwefelsäure. Baryumchlorid fällt dann Baryumsulfat aus, das in verdünnter Salzsäure unlöslich ist.

Quantitativ wird die Schwefelsäure entweder gravimetrisch als Baryumsulfat oder volumetrisch durch Titration mit $\frac{1}{10}$ n-Kalilauge bestimmt, und zwar unter Anwendung von Phenolphtalein als Indikator.

1000 cm^3 $\frac{1}{10}$ n-Kalilauge = $\frac{1}{10}$ Grammäquivalent Schwefelsäure = 4·9 *g* H_2SO_4.

Oxalsäure.

Die Oxalsäure und ihre Salze, z. B. das Sauerkleesalz, sind stark und rasch wirkende Gifte; der Tod von erwachsenen Menschen ist schon wenige Minuten nach Aufnahme der Oxalsäure eingetreten.

Oxalsäure ist in Form ihres sauren Kaliumsalzes, C_2O_4KH, und ihres Calciumsalzes im Pflanzenreiche außerordentlich weit verbreitet: besonders der Sauerampfer, Sauerklee und die Rhabarbergewächse zeichnen sich durch einen Reichtum an oxalsauren Salzen aus. Es kann also Oxalsäure durch Speisen und Medikamente pflanzlichen Ursprungs in den menschlichen Organismus gelangen. Ferner ist darauf zu achten, daß der Harn des Menschen normalerweise geringe Mengen von Oxalsäure enthält, nämlich 2—6—10 *mg* Oxalsäure in der Tagesmenge Harn. Bei der Untersuchung von Organteilen, Mageninhalt, Harn und anderen Leichenteilen wird es demnach häufig unerläßlich sein, die qualitativ nachgewiesene Oxalsäure auch quantitativ zu bestimmen.

Giftwirkung. Im Unterschiede zu den Mineralsäuren wirken nicht nur die freie Oxalsäure und das saure oxalsaure Kalium, das Sauerkleesalz, stark giftig, sondern auch selbst stark verdünnte Lösungen des neutralen oxalsauren Natriums, $C_2O_4Na_2$. Bei der Giftwirkung der Oxalsäure hat man demnach zwischen der lokalen Ätzwirkung, die am Orte der Applikation, teils auch bei der Ausscheidung zustande kommt, und der resorptiven, entfernten Wirkung zu unterscheiden. Die lokale Wirkung an der Applikationsstelle ist wie die aller Säuren eine ätzende und die lokale Wirkung am Ort der Ausscheidung beruht auf der Bildung und der Unlöslichkeit des Calciumoxalates. Infolge der großen Resorptionsfähigkeit des Organismus für Oxalsäure und deren Alkalisalze kommt die resorptive Wirkung unseres Giftes rasch zustande und dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß die Oxalsäure den Organen wie dem Herz und den Körperflüssigkeiten (Blut) das für den Lebensprozeß notwendige Calcium teils entzieht, teils in das unlösliche oxalsaure Calcium umwandelt. Im Blute wird durch oxalsaure Salze die Gerinnungsfähigkeit vermindert, ebenso wird die Alkaleszenz herabgesetzt, andrerseits nimmt der Zuckergehalt zu. Bei Oxalsäurevergiftung sinkt der ganze Stoffwechsel, also auch die Sauerstoffaufnahme und die Kohlensäureabgabe. Entsprechend der Verminderung der Stoffwechselvorgänge sinkt auch die Körpertemperatur. Die Kalkentziehung des Herzens äußert sich in Herzschwäche und schließlicher Herzparalyse. Die lokale Wirkung auf die Niere äußert sich in Verstopfung der gewundenen Harnkanälchen durch Calciumoxalatpfröpfe. Infolge Verlegung sämtlicher Harnkanälchen kann die Harnentleerung völlig stocken und der Tod durch Anurie und Urämie erfolgen. Die nach Einverleibung großer Dosen tödlich verlaufenden Oxalsäurevergiftungen enden meist recht rasch. *R. Kobert* (Intoxikation) beschreibt einen Fall, daß der Tod sogar binnen 10 Minuten eintrat.

Über die Verteilung der Oxalsäure in den Organen der damit Vergifteten liegen Angaben von *Bischoff*[1]) vor. In einem Falle, bei dem der Tod nach

---

[1]) *C. Bischoff*, Über Verteilung von Giften im Organismus des Menschen in Vergiftungsfällen. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **16.** 1337 (1883).

weniger als 15 Minuten eingetreten war, wurden die Organe getrennt untersucht und hierbei die folgenden Oxalsäuremengen gefunden:

In 2240 *g*	Magen, Speiseröhre, Darm und Inhalt	2·28 *g*	Oxalsäure
„ 770 *g*	Leber	0·285 *g*	„
„ 290 *g*	Nieren	0·0145 *g*	„
„ 180 *g*	Herzblut	0·0135 *g*	„
„ 40 *g*	Harn	0·0076 *g*	„

Auffallend ist hierbei der hohe Gehalt der Leber an Oxalsäure; Nieren und Harn sind bei der kurzen Dauer des Lebens nach der Vergiftung nur arm an dem Gifte gefunden worden. — Im sezernierten Harn fällt bei Oxalsäurevergiftung die reichliche Abscheidung von kristallisiertem oxalsauren Calcium auf.

Nachweis der Oxalsäure.

Wenn es sich nur um den Nachweis von Oxalsäure handelt, gleichgültig ob dieselbe als freie Säure, Sauerkleesalz oder Calciumoxalat vorhanden ist, so versetzt man das zerkleinerte Untersuchungsobjekt mit der 3—4fachen Menge Alkohol, fügt verdünnte Salzsäure bis zur stark sauren Reaktion hinzu und läßt unter häufigem Umrühren 1 bis 2 Stunden kalt stehen; dann gießt man die Flüssigkeit durch ein mit Alkohol benetztes Faltenfilter, spült den Rückstand mit Alkohol nach, versetzt das ganze gesammelte Filtrat mit etwa 20 *cm*³ Wasser, um beim Eindampfen die Bildung von Oxalsäureester zu vermeiden, und verdampft nun den Alkohol auf dem Wasserbade vollständig. Die zurückbleibende wässerige Lösung gießt man durch ein Filterchen und schüttelt das Filtrat in einem Scheidetrichter 3- bis 4mal mit je 50 bis 60 *cm*³ Äther tüchtig aus. Die sämtlichen Ätherauszüge läßt man einige Zeit in einem trockenen Kolben absitzen, gießt sie durch ein trockenes Filter und destilliert aus ihnen den Äther ab. Der Rückstand wird in 2 bis 3 *cm*³ Wasser gelöst, die Lösung, falls es nötig ist, durch ein angefeuchtetes Filterchen gegossen, dann mit Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion und mit gesättigter Calciumsulfatlösung versetzt. Entsteht hierbei ein Niederschlag, so säuert man mit Essigsäure schwach an und läßt das Gemisch bedeckt einige Stunden, am besten bis zum anderen Tage, stehen. Bleibt ein kristallinischer Niederschlag zurück, so kann dieser aus oxalsaurem Calcium bestehen. Eine eingehende mikroskopische Untersuchung der Niederschläge ist stets angezeigt; Oktaeder mit einem durchsetzten Kreuz, sogenannte Briefkuvertformen, sind für oxalsaures Calcium charakteristisch. Das auf einem Filter gesammelte und ausgewaschene Calciumoxalat kann durch Glühen in einem tarierten Platintiegel über dem Gebläse in Calciumoxyd übergeführt und dieses gewogen werden.

Berechnung. CaO (56) : $C_2H_2O_4 + 2H_2O$ (126) = gefundene Menge CaO : x. Da der zur Ausrechnung kommende Quotient 56 : 126 = 0·444 ist, so muß demnach das erhaltene Gewicht an Calciumoxyd mit 0·444 multipliziert werden, um die entsprechende Menge an kristallisierter Oxalsäure zu erfahren.

Der Nachweis der freien Alkalien.

Kalilauge, Natronlauge, Ammoniak, freie Alkalien.

Mit dem Nachweis der Alkalien verhält es sich geradeso wie mit demjenigen der Mineralsäuren. Da Kalium- und Natriumverbindungen im Tier- und Pflanzenorganismus normalerweise überall vorkommen und Ammoniak ein Zersetzungsprodukt stickstoffhaltiger organischer Materie ist, muß bei einer derartigen Untersuchung der Nachweis geführt werden, daß die Alkalien im freien Zustande vorhanden sind, denn nur diese und ihre kohlensauren Salze wirken auf das tierische Gewebe zerstörend und stark ätzend und nicht ihre neutralen Salze.

Die durch Alkalilaugen erzeugten Ätzungen sind den durch ätzende Säuren hervorgebrachten Vergiftungen dadurch ähnlich, daß auch hier nach Zufuhr der Laugen per os Schmerzen im Mund, Schlund, Speiseröhre, Magen und Unterleib auftreten, die auf Ätzungen beruhen. Während aber die geätzten Stellen bei der Ätzung durch Mineralsäuren, wie bei der durch Schwefelsäure trocken und brüchig werden („feste Mortifikation“), werden die durch Laugenätzung hervorgerufenen geätzten Partien weich und schmierig, weil die durch Lauge gebildeten Alkalialbuminate gelatinös aufquellen, ja bei Gegenwart von viel Wasser sich teilweise lösen können. Man spricht in der gerichtlichen Medizin von „Kolliquation“ (Erweichung, Verflüssigung). Die zerstörende Wirkung der Ätzalkalien geht weit in die Tiefe und in die Umgebung der geätzten Stellen. Leimgebendes Gewebe und Hornsubstanz, die Haare und die Haut quellen mit Alkalilaugen ebenfalls stark auf und gehen schließlich in Lösung. Der Magen ist bei Laugenvergiftung erweicht, korrodiert und von auffallend hellroter Farbe.

Ammoniak.

Freies Ammoniak erkennt man meist schon an seinem Geruche, ferner an der Bläuung eines über dem Untersuchungsmaterial gehaltenen, angefeuchteten roten Lackmuspapiers oder an der Schwärzung eines mit Mercuronitratlösung befeuchteteten Papiers.

Destillation. Man zieht das gehörig zerkleinerte Untersuchungsmaterial, falls es stark alkalisch reagiert, in einer gut verschließbaren Glasstöpselflasche mehrere Male mit absolutem Alkohol aus und unterwirft die vereinigten abfiltrierten Auszüge der Destillation. Man fängt das Destillat in wenig verdünnter Salzsäure auf, verdampft es dann im Porzellanschälchen auf dem Wasserbade zur Trockne, löst einen bleibenden Verdampfungsrückstand im Wasser und prüft diese Lösung mit *Nesslers* Reagens und mit Platinchloridchlorwasserstoffsäure auf einen Gehalt an Ammoniak. — Der Destillationsrückstand dient zur Prüfung auf die fixen Alkalien.

Fixe Alkalien.

Im Destillationsrückstande, der im Destillationsgefäße bleibt, können sich Ätzkali und Ätznatron vorfinden. Reagiert der Rückstand stark alkalisch, so wird eine Probe desselben erst mit wenig Phenolphtaleinlösung, dann mit überschüssiger Baryumchloridlösung versetzt. Rührte die Rotfärbung der Phenolphtaleinlösung ausschließlich von kohlensauren Alkalien her, so verschwindet jetzt die Alkalinität, weil nach der folgenden Gleichung zwei neutral reagierende Salze entstehen:

$$K_2CO_3 + BaCl_2 = BaCO_3 + 2\,KCl.$$

Sind aber fixe Alkalien vorhanden, so bleibt die Rotfärbung bestehen, indem in diesem Falle löslicher Ätzbaryt entsteht:

$$2\,KOH + BaCl_2 = Ba(OH)_2 + 2KCl,$$

dessen Lösung sich mit Phenolphtalein ebenfalls rot färbt.

Zur Unterscheidung von Kali- und Natronlauge neutralisiert man den übrigen Teil des nach dem Abdestillieren des Alkohols gebliebenen Rückstandes mit verdünnter Salzsäure und prüft die Lösung mit Platinchloridchlorwasserstoffsäure, $(PtCl_6)H_2$, und mit Natriumkobaltinitrit, $(Co(NO_2)_6)K_3$, auf Kalium und mit Kaliumpyroantimoniat, $Sb_2O_7H_2K_2$, auf Natrium.

Chlorsaures Kalium.

Das chlorsaure Kalium ist in größeren Dosen, 4—6—10 *g*, ein stark wirkendes Gift, das in der ersten Phase der Giftwirkung dadurch wirkt, daß es die roten Blutkörperchen verändert: das Oxyhämoglobin wird in den intakten Blutkörperchen in braunes Methämoglobin umgewandelt. Diesem Stadium folgt alsbald, wenigstens bei schwerer Vergiftung, eine Gestaltsveränderung, nämlich eine Schrumpfung und ein Zerfall von roten Blutkörperchen. Die Toxikologen (vgl. *R. Kobert*, Intoxikationen) nehmen an, daß die Veränderung des Blutfarbstoffes und der roten Blutkörperchen durch eine, dem chlorsauren Kalium in hohem Grade zukommende, spezifische Salzwirkung bedingt sei. Durch die letztere erklärt sich dann auch die zu Beginn der Vergiftung durch chlorsaures Kalium auftretende Salzdiurese, durch welche das Blut stark eingedickt wird. — Höchst bemerkenswert ist ferner das starke Alkalischwerden des Harns, was im Blute umgekehrt eine Alkaliverarmung das Plasmas zur Folge hat. Bei schwerer Chloratvergiftung wird soviel Oxyhämoglobin in Methämoglobin umgewandelt, daß der Sauerstoffgehalt des Blutes auf 1% sinken kann. Die Folge davon ist, daß bei den betreffenden vergifteten Menschen oder Tieren Erstickung durch Sauerstoffmangel eintreten kann. Chlorsaures Kalium schwächt durch Kaliwirkung das Herz.

Charakteristisch für die Vergiftung durch chlorsaures Kalium ist die schokoladenbraune Verfärbung des Blutes (s. oben).

Die Ausscheidung von innerlich aufgenommenem Kaliumchlorat durch die Niere kann ziemlich rasch erfolgen; nach Einnahme von 0·1 *g* chlorsaurem Kalium kann man im Harn schon nach einer Stunde Chlorsäure nachweisen, und zwar geht die größte Menge desselben unverändert in den Harn über; nur ein kleiner Teil des aufgenommenen chlorsauren Salzes wird zu Chlorkalium reduziert. Der bei Chloratvergiftung entleerte Harn ist meist stark dunkel, selbst schwarz gefärbt und kann Hämoglobin und Methämoglobin enthalten; er ist meist undurchsichtig, reagiert häufig stark alkalisch, ist eiweißhaltig und scheidet bei längerem Stehen ein braunschwarzes Sediment ab.

Besteht Verdacht auf Vergiftung durch ein chlorsaures Salz, so muß in erster Linie auch der Harn, falls solcher vorliegt, eingehend chemisch und mikroskopisch untersucht werden. Es kann freilich bei Chloratvergiftung dem Tode eine mehrtägige Anurie vorausgehen, so daß für die chemische Untersuchung Harn überhaupt nicht zu haben ist.

Nachweis der Chlorsäure.

Chlorsaures Kalium kann aus organischem Material nur mit Hilfe eines Dialysators abgeschieden werden. Man nehme ein möglichst flaches Dialysiergefäß, weil die Diffusion um so rascher vor sich geht, je dünner die Schicht im inneren Behälter und je größer die Wassermenge im äußeren Gefäße ist. Man bringt die betreffenden Leichenteile, wie Organteile, Mageninhalt, Darminhalt, in den inneren Behälter eines flachen Dialysators und in das äußere Gefäß reines Wasser und läßt, ohne Wasserwechsel im äußeren Gefäß, 5—6 Stunden stehen. Das Dialysat, also den Inhalt des äußeren Gefäßes, dunstet man in einer flachen Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in wenig Wasser auf und untersucht die abfiltrierte Lösung in der folgenden Weise auf Chlorsäure:

1. Man versetzt eine Probe der Lösung mit verdünnter Schwefelsäure und einigen Tröpfchen Indigolösung bis zur deutlichen Blaufärbung und fügt dann tropfenweise schweflige Säure hinzu. Enthält die Lösung Chlorsäure, so verschwindet jetzt die blaue Farbe und geht in Gelb oder Grüngelb über. Empfindliche Probe auf Chlorsäure, mit der sich noch 0·01 *g* $KClO_3$ nachweisen läßt.

2. Man versetzt die erhaltene Lösung mit überschüssigem Silbernitrat; entsteht ein Niederschlag (AgCl), so wird er abfiltriert und das klare Filtrat mit einigen Tropfen schwefliger Säure zusammengebracht; ist chlorsaures Salz vorhanden, so entsteht abermals ein Niederschlag von Chlorsilber, der im Unterschiede zum schwefligsauren Silber in heißer, verdünnter Salpetersäure unlöslich ist.

3. Ist die fragliche Lösung chlorsäurehaltig, so entwickelt sie beim Erhitzen mit Salzsäure Chlor, welches aus Jodkaliumlösung Jod frei macht, das mit Chloroform nachgewiesen werden kann. — Diese Reaktion

beweist nur dann das Vorhandensein von Chlorsäure, wenn keine anderen Substanzen zugegen sind, die, wie chromsaure und dichromsaure Salze, mit Salzsäure ebenfalls Chlor entwickeln.

Quantitative Bestimmung der Chlorsäure.

Die quantitative Bestimmung des Kaliumchlorates im Harn oder im Dialysat oder in anderen Flüssigkeiten gelingt am besten mit Hilfe der Zinkstaubmethode.

Man teilt die betreffende Flüssigkeit in zwei gleiche Teile und bestimmt in der einen Hälfte gewichtsanalytisch oder nach der *Volhard*schen Titriermethode die etwa vorhandenen Chloride.

In der zweiten Hälfte der Flüssigkeit bestimmt man die Chloride und das Chlorat zusammen, indem man 5—10 *g* Zinkstaub und wenig verdünnte Schwefelsäure oder besser Essigsäure hinzufügt und diese Mischung $^1/_2$—1 Stunde lang auf dem kochenden Wasserbade erhitzt. Dann filtriert man ab, wäscht den Rückstand mit kochendem Wasser aus, säuert das Filtrat mit Salpetersäure an und bestimmt das Chlor wie das erstemal. Hierbei wird natürlich mehr Chlor gefunden als bei der ersten Bestimmung, wenn chlorsaures Salz vorhanden war. Aus der Differenz der beiden Chlorbestimmungen läßt sich die Menge Kaliumchlorat berechnen. 1 Mol. $KClO_3$ gibt bei der Reduktion 1 Mol. KCl, also auch 1 At. Chlor.

Verhalten des chlorsauren Kaliums bei der Leichenfäulnis.

Nach *C. Bischoff* wird chlorsaures Kalium in Mischung mit feuchten organischen Stoffen, namentlich Blut, sehr bald zu Chlorkalium reduziert. *Bischoff* beschreibt verschiedene Fälle von Vergiftungen mit chlorsaurem Kalium, bei welchem trotzdem der chemische Nachweis der Chlorsäure in den Leichenteilen nicht mehr geführt werden konnte. 100 *g* Blut + 0·5 *g* ClO_3K + 100 *g* Wasser wurden bei Zimmertemperatur 5 Tage lang stehen gelassen; in dem Dialysate konnte keine Spur Chlorsäure nachgewiesen werden. *C. Bischoff* ist auf Grund seiner Versuche zu der Ansicht gelangt, daß chlorsaures Kalium, in Mischung mit feuchten organischen Substanzen, namentlich auch mit Blut, sehr bald reduziert wird, so daß nicht unschwer Fälle möglich sind, wo selbst bei rasch tödlich verlaufenden Vergiftungsfällen mit chlorsaurem Kalium der chemische Nachweis der Chlorsäure nicht mehr zu führen ist.

Die Untersuchung auf Santonin, Sulfonal, Trional.

Die an dieser Stelle aufgenommenen, stark wirkenden Arzneistoffe lassen sich wegen ihres Löslichkeitsverhaltens in kaltem, weinsäurehaltigem Wasser und in Äther nicht gut in den allgemeinen Untersuchungsgang nach *Stas-Otto* einreihen. Zum Nachweis dieser Arzneistoffe in irgend einem Untersuchungsmaterial arbeitet man in der folgenden Weise:

Man kocht das eventuell mit Weinsäure neutralisierte oder schwach angesäuerte Untersuchungsobjekt unter Rückfluß mit absolutem Alkohol aus, filtriert heiß ab und dunstet das Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Bleibt ein Rückstand, so wird er in heißem Wasser gelöst.

diese Lösung, falls sie gefärbt oder sonst stark verunreinigt ist, auf dem Wasserbade unter häufigem Umschütteln mit wenig Blutkohle einige Zeit erhitzt und noch heiß abfiltriert. Liegen größere Mengen der in Betracht kommenden Substanzen vor, so kristallisieren diese zum Teil schon während des Erkaltens aus. Die wässerige abfiltrierte Flüssigkeit wird, eventuell mit den ausgeschiedenen Kristallen, mehrere Male mit Chloroform tüchtig ausgeschüttelt, die Chloroformschicht im Scheidetrichter getrennt und durch ein trockenes Filter gegossen. Der beim Eindunsten dieser Chloroformlösung bleibende Rückstand kann Santonin, Sulfonal und Trional enthalten.

Bei dieser Extraktionsmethode finden sich natürlich auch diejenigen Stoffe im Chloroformrückstande vor, die nach dem Verfahren von *Stas-Otto* in den sauren Ätherauszug übergehen. Verschiedene dieser Substanzen, wie Colchicin, Antipyrin, Koffein, Acetanilid, Phenacetin und Salicylsäure, werden nach dieser „Chloroformmethode" vollständiger ausgezogen und meistens auch in einem reineren Zustande erhalten, als dies bei der üblichen Extraktion mit Äther der Fall ist. Auch das schwach basische Narkotin kann sich in dem Verdunstungsrückstande des Chloroformauszuges vorfinden.

Santonin.

Santonin, $C_{15}H_{18}O_3$, kristallisiert in farb- und geruchlosen, glänzenden Blättchen, die bitter schmecken und bei 170° schmelzen. Es wird von 5000 Teilen kaltem, 250 Teilen siedendem Wasser, von 44 Teilen Weingeist sowie von 4 Teilen Chloroform gelöst; alle diese Lösungen reagieren neutral. Seine Löslichkeit in Äther ist gering (1:150). Die weißen Santoninkristalle nehmen am Lichte eine gelbe Farbe an; die Lösung dieser gelben Modifikation des Santonins in Weingeist läßt beim Eindampfen weißes Santonin zurück. — Santonin muß als das innere Anhydrid, Lakton, einer Säure, nämlich der Santoninsäure, $C_{15}H_{20}O_4$, aufgefaßt werden, denn ätzende Alkalien und die ätzenden alkalischen Erden lösen das Santonin zu Salzen dieser Säure auf.

Säuert man die Lösung eines santoninsauren Salzes mit Salzsäure an, so scheidet sich zunächst freie Santoninsäure aus, welche auch dem Gemisch als solche entzogen werden kann, wenn sie sofort mit Äther ausgeschüttelt wird. Bei längerem Stehen geht die Säure unter Abspaltung von 1 Mol. Wasser in ihr inneres Anhydrid, das Santonin, über.

Verhalten im Tierkörper. Santonin scheint im Organismus nur unvollständig zur Resorption zu gelangen. *M. Jaffé*[1]) hat Hunden und Kaninchen größere Mengen von Santonin verfüttert. Aus dem Harn der Hunde erhielt er einen neuen Körper, in einer Menge von 5—6% des verfütterten Santonins, α-Oxysantonin ($C_{15}H_{18}O_4$) genannt; aus den

[1]) *M. Jaffé*, Über Oxysantonine und ihre Entstehung im Tierkörper nach Darreichung von Santonin. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 22. 337 (1896—1897).

Exkrementen des Hundes konnten durch Auskochen mit Chloroform namhafte Mengen von unverändert gebliebenem Santonin gewonnen werden. — Im Organismus der Kaninchen, welche die Fütterung mit Santonin gewöhnlich wochenlang gut vertragen, entsteht das α-Oxysantonin nur in sehr geringer Menge; im Ätherextrakt des Kaninchenharns fand *Jaffé* neben viel unverändert gebliebenem Santonin ein zweites Santoninderivat, das β-Oxysantonin, das mit dem α-Oxysantonin isomer ist. Bei diesen Versuchen mit den Kaninchen ist immer nur etwa die Hälfte des verfütterten Santonins zur Resorption gelangt.

Im Harn des Menschen tritt nach Einnahme von Santonin ein roter Farbstoff, Santoninrot genannt, auf. Santoninharn ist, auch nach medizinalen Dosen, rot gefärbt oder färbt sich wenigstens scharlachrot bis purpurfarben, wenn er mit Kali- oder Natronlauge versetzt wird. Auch auf Zusatz von Ätzkalk färbt sich santoninhaltiger Harn karminrot.

Nachweis des Santonins.

Santonin läßt sich nur neutralen oder sauer reagierenden Flüssigkeiten mit Äther, Benzol oder besser mit Chloroform entziehen. In alkalischen Flüssigkeiten wird es zu santoninsauren Salzen gelöst, die in die angeführten Lösungsmittel nicht übergehen. Da Santonin kein Alkaloid ist, gibt es mit den allgemeinen Alkaloidreagenzien auch keine Niederschläge; jedoch sind verschiedene Farbenreaktionen für dasselbe mehr oder weniger charakteristisch.

1. Reines Santonin löst sich beim Erwärmen mit alkoholischer Kalilauge mit schön karminroter Farbe, die allmählich in Rotgelb übergeht, um schließlich ganz zu verblassen. — Gelb gewordenes Santonin löst sich in alkoholischer Kalilauge mit gelbroter Farbe auf.

2. Schüttelt man gepulvertes Santonin (0·01 *g*) mit einer kalten Mischung aus 1 cm^3 Schwefelsäure und 1 cm^3 Wasser, so tritt keine Färbung auf; erhitzt man dann fast zum Sieden und fügt einen Tropfen Eisenchloridlösung hinzu, so färbt sich das Gemisch violett.

3. Erwärmt man ein Gemisch aus 2—3 Tropfen einer alkoholischen Santoninlösung und 1—2 Tropfen alkoholischer Furfurollösung (2%ig) mit 2 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade, so nimmt es eine purpurrote Färbung an, die bei fortgesetztem Erwärmen in Karmoisinrot, Blauviolett und schließlich in Dunkelblau übergeht *(Thaeter).*[1])

Alkaloide und Glukoside, die mit Furfurolschwefelsäure scharfe Farbenreaktionen geben, sind nicht sehr zahlreich; zu ihnen gehören u. a. Veratrin, Pikrotoxin (violett) und Piperin (grün bis grünblau, zuletzt indigoblau). Auch α- und β-Naphtol geben mit Furfurolschwefelsäure charakteristische Färbungen.

---

[1]) *K. Thaeter*, Beiträge zur forensischen Chemie. Archiv d. Pharmazie. **235**. 401 (1897).

Sulfonal.

Sulfonal, $C_7H_{16}O_4S_2$, bildet farb-, geruch- und geschmacklose, prismatische Kristalle, die bei 125—126° schmelzen und gegen 300° unter geringer Zersetzung destillieren. Sulfonal löst sich in 500 Teilen kaltem und in 15 Teilen siedendem Wasser, in 135 Teilen Äther sowie in 65 Teilen kaltem und in 2 Teilen siedendem Alkohol; von Chloroform wird Sulfonal sehr leicht gelöst. Die Lösungen des Sulfonals verändern Lackmuspapier nicht. Sulfonal zeichnet sich durch große Beständigkeit gegen chemische Agenzien aus: die Halogene, Halogenwasserstoffsäuren, ätzenden und kohlensauren Alkalien, sowie konz. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure wirken in der Kälte auf Sulfonal nicht ein.

Nachweis des Sulfonals.

Sulfonal läßt sich der sauren, neutralen und alkalischen Flüssigkeit mit Äther, besser mit Chloroform entziehen und wird im Verdunstungsrückstand dieser Lösungen in der folgenden Weise nachgewiesen:

1. Bestimmung des Schmelzpunktes: Dieser liegt bei 125—126°, falls das Sulfonal absolut rein ist. Sulfonal wird durch Umkristallisieren aus kochendem Wasser unter Zuhilfenahme von wenig Blutkohle leicht rein erhalten. Die erhaltenen fraglichen Kristalle mische man mit notorisch reinem Sulfonal: auch dieses Gemisch muß dann ebenfalls bei 125—126° schmelzen, falls die fragliche Substanz aus Sulfonal besteht.

2. Beim Erhitzen eines Gemisches von Sulfonal und gepulverter Holzkohle in einem Probierröhrchen tritt der charakteristische Merkaptangeruch auf.

3. Nachweis des Schwefels. *a)* Mit Natrium: Beim Zusammenschmelzen des Sulfonals mit wenig metallischem Natrium in einem trockenen Papierröhrchen entsteht Schwefelnatrium, das man in der wässerigen Lösung der erkalteten Schmelze mit Nitroprussidnatrium oder mit Bleioxydnatron erkennt.

b) Mit Cyankalium. Schmilzt man in einem trockenen Probierröhrchen Sulfonal mit etwa der doppelten Menge von reinem Cyankalium zusammen, so tritt der durchdringende Merkaptangeruch auf und es entsteht gleichzeitig Rhodankalium. Die wässerige Lösung der Schmelze färbt sich daher nach dem Ansäuern mit verdünnter Salzsäure mit 1—2 Tröpfchen Eisenchloridlösung tiefrot.

c) Mit Eisenpulver. Beim Erwärmen des Sulfonals mit reinem, schwefelfreiem Eisenpulver macht sich ein knoblauchartiger Geruch bemerkbar und der Rückstand entwickelt mit Salzsäure Schwefelwasserstoff, der mit „Bleipapier“ erkannt wird.

Nachweis des Sulfonals im Harn.

Sulfonal wirkt kumulativ; die Substanz kann sich daher in größerer Menge im Organismus anhäufen, wenn Sulfonal längere Zeit unaus-

gesetzt in größeren Dosen innerlich eingenommen wird. Die Hauptmenge des aufgenommenen Sulfonals erscheint im Harn als Äthylsulfosäure. $C_2H_5.SO_2.OH$. Infolge der Bildung dieser Säure ist bei Sulfonalintoxikation der Ammoniakgehalt des Harns geradeso wie nach Eingabe von Mineralsäuren stark vermehrt.

Nur nach größeren Dosen von Sulfonal, besonders nach unausgesetzter Darreichung desselben, findet sich Sulfonal in nachweisbarer Menge im Harne vor. Ein solcher Harn ist dann manchmal durch einen Gehalt an Hämatoporphyrin dunkelrot bis granatbraun gefärbt; doch tritt dieses Zersetzungsprodukt des Blutfarbstoffes nur bei schwerer Sulfonalintoxikation im Harne und auch da nur in vereinzelten Fällen auf.

Zur Abscheidung des Sulfonals aus dem Harn wird etwa 1 Liter Harn oder mehr auf den 10. Teil seines Volumens eingedampft und der Rückstand wiederholt mit größeren Mengen Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge läßt man in einer trockenen Flasche einige Stunden absitzen, gießt sie durch ein trockenes Filter und destilliert aus dem Filtrate den Äther ab. Der Destillationsrückstand wird mit 20—30 cm^3 10%iger Natronlauge auf dem Wasserbade zur Trockne eingedunstet, wodurch die färbenden Extraktivstoffe, die aus dem Harn mit in den Äther übergegangen sind, beseitigt werden, während Sulfonal unverändert bleibt. Dem alkalischen Rückstande entzieht man wiederum mit Äther das Sulfonal, welches beim Verdunsten des Lösungsmittels fast farblos und rein zurückbleibt. Von dem Ätherrückstande bestimmt man den Schmelzpunkt und weist mittelst der oben angegebenen Proben das Sulfonal nach.

Nachweis des Hämatoporphyrins im Harn bei Sulfonalintoxikation.

In rot, braunrot oder kirschrot gefärbten Harnen sind Farbstoffe beobachtet worden, die mit Hämatoporphyrin höchstwahrscheinlich identisch sind. Die spektroskopische Untersuchung eines solchen Harns geschieht folgendermaßen: Man versetzt etwa $^1/_2$ *l* Harn tropfenweise mit Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion, dann mit wenig Baryumchloridlösung; nach einigem Stehen wird der Niederschlag, der nun den Farbstoff enthält, abfiltriert, gut ausgewaschen und auf dem Filter mit heißem Alkohol, der einige Tropfen verdünnte Schwefelsäure enthält, ausgezogen. Das so erhaltene Filtrat kann direkt spektroskopisch, am besten mit dem *Browning*schen Taschenspektroskop, untersucht werden. Die sauren Hämatoporphyrinlösungen sind violett, konzentriertere kirschrot gefärbt und zeigen ein charakteristisches Spektrum mit zwei Absorptionsstreifen. Übersättigt man hierauf die saure alkoholische Lösung mit einigen Tropfen Ammoniak oder Natronlauge, so wird das Spektrum der alkalischen Hämatoporphyrinlösung mit vier Absorptionsstreifen sichtbar. Hämatoporphyrin findet sich häufig in Spuren im normalen Harn.

Trional, Diäthylsulfonmethylmethan, $(C_2H_5)(CH_3)C(SO_2C_2H_5)_2$, bildet farblose, glänzende, geruchlose Kristalltafeln vom Schmelzpunkt 76°, die sich in 320 Teilen Wasser zu einer bitter schmeckenden, Lackmuspapier nicht verändernden Flüssigkeit lösen. Durch den bitteren Geschmack unterscheidet sich das Trional von dem sonst ähnlichen, aber geschmacklosen Sulfonal. Trional gibt die Reaktionen des Sulfonals. Da Trional im menschlichen Organismus vollständig zerlegt wird, ist die kumulative Wirkung desselben eine geringere als beim Sulfonal. Auch Hämatoporphyrinurie ist selbst nach größeren Dosen von Trional und bei wochenlangem, unausgesetztem Gebrauche fast nie beobachtet worden.

Cytisin.

Cytisin, $C_{11}H_{14}N_2O$, findet sich zu etwa 1·5% in dem reifen Samen des Goldregens, dem Samen von Cytisus Laburnum, und ist identisch mit dem, aus dem Samen von Ulex europaeus dargestellten und ursprünglich Ulexin genannten Alkaloid *(A. Partheil)*.

Cytisin kristallisiert in großen, farb- und geruchlosen Prismen, die bei 152° schmelzen und die bei vorsichtigem stärkeren Erhitzen unzersetzt sublimieren. In Wasser, Alkohol, Chloroform und in Essigäther ist es leicht löslich, weniger leicht in käuflichem Äther, Benzol und Aceton und fast unlöslich in Petroläther und absolutem Äther.

Cytisin ist eine starke, sekundäre Base von stark giftigen Eigenschaften. Obwohl es sich mit 1 und mit 2 Mol. Salzsäure verbinden kann, verhält es sich sonst als einsäurige Base, indem es nur mit einem Äquivalent Säure gut kristallisierende Salze bildet. Als sekundäre Base gibt Cytisin mit salpetriger Säure ein in Nadeln kristallisierendes Nitrosocytisin, $C_{11}H_{13}ON N.NO$. Erwärmt man Cytisin mit der doppelten Menge konzentrierter Salpetersäure auf dem Wasserbade, so färbt sich die Lösung unter Entwicklung nitroser Gase alsbald rotgelb bis braun und scheidet dann beim Eingießen in Wasser Nitronitrosocytisin, $C_{11}H_{12}ON(NO_2)N.NO$ ab, das aus Wasser in blaßgelben, bei 242—244° schmelzenden Schuppen kristallisiert.

Cytisin ist ein Krampfgift, das in seiner Wirkung dem Strychnin durchaus ähnlich ist, nur daß beim Cytisin noch eine Reizwirkung auf die Magendarmschleimhaut hinzukommt, die bis zur blutigen Entzündung führen kann. Im Gegensatz zum Strychnin wird durch Cytisin auch das Brechzentrum gereizt; beim Menschen und erbrechenfähigen Tieren wird daher nach Einnahme von Cytisin oder Goldregenpräparaten ein großer Teil des zugeführten Giftes wieder erbrochen. Wie Strychnin wirkt Cytisin reizend auf das Atemzentrum und vasomotorische Zentrum; schließlich tritt der Tod wie bei Strychninvergiftung durch Lähmung dieser beiden Zentra ein. Ein Teil des aufgenommenen Cytisins verläßt den Organismus unverändert und findet sich als solcher im Harn vor.

Nachweis des Cytisins.

Sind Erbrochenes, Mageninhalt oder Organteile auf einen Gehalt an Cytisin zu untersuchen, so stellt man sich nach dem allgemeinen Untersuchungsgange auf Alkaloide eine wässerige, weinsaure Lösung her, welche zur Entfernung der letzten Spuren von Fett und freien Fettsäuren mit Äther erst ausgeschüttelt wird, dann wird die abgetrennte wässerige Flüssigkeit mit Natronlauge alkalisch gemacht und mit Chloroform oder besser mit Isobutylalkohol wiederholt tüchtig ausgeschüttelt.

Ein beim Eindunsten des Chloroform- oder Isobutylalkoholauszuges bleibender Rückstand wird mit Hilfe der folgenden Reaktionen auf Cytisin geprüft.

1. Eisenchloridlösung färbt Cytisin und seine Salze blutrot; beim Verdünnen mit Wasser, beim Ansäuern sowie auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd verschwindet die rote Färbung. Erwärmt man die mit Wasserstoffsuperoxyd versetzte Mischung auf dem Wasserbade, so tritt eine intensive Blaufärbung auf (*Van der Moer*[1]).

2. Mit Nitrobenzol, das wenig Dinitrotiophen enthält, übergossen, gibt Cytisin eine ziemlich beständige rotviolette Färbung (*A. Rauwerda*[2]). Coniin gibt eine ähnliche, aber sehr unbeständige Färbung.

3. Die Bildung des Nitrosonitrocytisins (s. oben) aus Cytisin mit konzentrierter Salpetersäure läßt sich zum Nachweis kleiner Mengen des Alkaloids mit Vorteil verwenden. Nitronitrosocytisin kristallisiert aus 94⁰/₀igem Alkohol in derben Säulen und aus 50⁰/₀igem Alkohol in flachen Täfelchen. Aus seiner Lösung in konzentrierter Salzsäure wird es durch Wasser wieder unverändert ausgefällt.

Die Digitalisglukoside.

Die Digitalispflanze, Digitalis purpurea L., enthält in allen ihren Teilen, vorzugsweise aber in ihren Blättern und Samen, arzneilich brauchbare Substanzen, welche in die Gruppe der Glukoside gehören. Von solchen Digitalisglukosiden sind bis jetzt drei als kristallisierende, einheitlich zusammengesetzte, wohl charakterisierte Stoffe isoliert worden, nämlich das Digitalin im engeren Sinne oder Digitalinum verum crystallisatum Kiliani von der Zusammensetzung $C_{35}H_{56}O_{14}$, das Digitoxin, $C_{34}H_{54}O_{11}$, und das Digitonin $C_{55}H_{94}O_{28}$. Ein viertes Digitalisglukosid, nämlich das Digitalein, ist bis jetzt noch nicht im chemisch reinen Zustande erhalten worden.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. Pharmaz. Gesellschaft. 5. 267 (1895).

[2]) *A. Rauwerda,* Beiträge zur Kenntnis des Cytisins und seiner Alkylderivate. Chem. Zentralbl. 1900. II. 268 und Nederl. Tijdschr. 12. 161 (1800).

Digitonin.

Digitonin, $C_{55}H_{94}O_{28}$ oder $C_{54}H_{92}O_{28}$[1]), findet sich fast nur in den Samen der Digitalispflanze vor, die Blätter enthalten höchstens Spuren davon. Digitonin, das man gegenwärtig zu den Saponinen zählt (vgl. diese), kristallisiert aus Alkohol in feinen Nadeln und ist in 50 Teilen Alkohol von 50% löslich. Schon eine ganz verdünnte Salzsäure spaltet Digitonin hydrolytisch in Digitogenin, Dextrose und Galaktose[2]):

$$\underset{\text{Digitonin}}{C_{55}H_{94}O_{28}} + 2H_2O = \underset{\text{Digitogenin}}{C_{31}H_{50}O_6} + \underset{\text{Dextrose}}{2C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Galaktose.}}{2C_6H_{12}O_6(?)}$$

Digitonin kristallisiert aus Alkohol in feinen Nadeln, die bei 235° unter Gelbfärbung erweichen. Digitonin ist kein Herzgift. Reines Digitonin gibt mit konzentrierter Schwefelsäure eine, auf Zusatz von wenig Bromwasser intensiver werdende Rotfärbung.

Digitoxin.

Digitoxin, $C_{34}H_{54}O_{11}$, ist fast ausschließlich in den Digitalisblättern enthalten, sehr wirksam und ungemein giftig. Es ist in Wasser und in Äther fast unlöslich, löst sich aber in Alkohol und in Chloroform: man kann es daher aus seiner Lösung in Chloroform mit Äther ausfällen. Aus Alkohol von 85% kristallisiert es in Blättchen vom Schmp. 145°. Alkoholische Salzsäure hydrolysiert Digitoxin zu Digitoxigenin und Digitoxose:

$$\underset{\text{Digitoxin}}{C_{34}H_{54}O_{11}} + H_2O = \underset{\text{Digitoxigenin}}{C_{22}H_{32}O_4} + \underset{\text{Digitoxose.}}{2C_6H_{12}O_4}$$

Digitoxin löst sich in konzentrierter Schwefelsäure mit bräunlicher oder grünlichbrauner Farbe, die durch Brom nicht verändert wird.

Digitoxinreaktion von *H. Kiliani.* Man löst eine Spur Digitoxin in 3—4 *cm*³ eisenhaltigem Eisessig (100 *cm*³ Eisessig + 1 *cm*³ 5%ige Ferrisulfatlösung) und schichtet einige Kubikzentimeter eisenhaltige konzentrierte Schwefelsäure (100 *cm*³ Schwefelsäure + 1 *cm*³ 5%ige Ferrisulfatlösung) darunter: an der Berührungsstelle der beiden Flüssigkeitsschichten entsteht zunächst eine dunkle Zone, über der sich nach etwa 2 Minuten ein blauer Streifen bildet, und bei längerem Stehen färbt sich die ganze Eisessigschicht tief indigoblau.

Digitalinum verum.

Digitalin, $C_{35}H_{56}O_{14}$, findet sich nach *Kiliani* nur in den Digitalissamen, ist in Wasser 1 : 1000 löslich und sehr wirksam. Beim Kochen

---

[1]) Die Ergebnisse der Untersuchungen von *A. Windaus* über Digitonin [Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **42**. 238 (1909)] sprechen zugunsten der Formel $C_{55}H_{94}O_{28}$.

[2]) *H. Kiliani,* Über Digitonin und Digitogenin. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **24**. 340 (1891).

seiner alkoholischen Lösung mit sehr verdünnter Salzsäure wird es in Digitaligenin und in zwei Zucker, nämlich in Dextrose und Digitalose, hydrolytisch gespalten:

$$\underset{\text{Digitalin}}{C_{35}H_{56}O_{14}} + H_2O = \underset{\text{Digitaligenin}}{C_{22}H_{30}O_3} + \underset{\text{Dextrose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Digitalose.}}{C_7H_{14}O_5\ (?)}$$

Reines Digitalin färbt sich mit konzentrierter Schwefelsäure orangegelb; die Lösung nimmt bald eine blutrote und auf Zusatz von wenig Bromwasser eine kirsch- und blaurote Färbung an. Statt des Bromwassers kann auch ein Tröpfchen Salpetersäure oder Eisenchloridlösung genommen werden. Sicherer und weit dauerhafterer, auf 1—2 Stunden, erhält man diese Reaktion, wenn man eine Spur Digitalin direkt in englischer Schwefelsäure ohne weiteren Zusatz löst.

Konzentrierte Salzsäure löst Digitalin mit goldgelber, beim Erwärmen in Granat- bis Violettrot übergehender Farbe.

Über das Schicksal der Digitalisglukoside im menschlichen Organismus und über die Natur ihrer Umwandlungs- und Ausscheidungsprodukte ist bis jetzt nichts sicheres bekannt. Eine Ausscheidung der drei wirksamen Substanzen durch den Harn ist beim Menschen noch niemals beobachtet worden, und auch bei Tieren hat *R. Kobert* im Harn nur in ganz vereinzelten Fällen etwas wirksames nachweisen können. Im Blute und in den Organen konnte bisher keiner der in Frage kommenden Digitalisstoffe wieder gefunden werden. Bei toxikologischen Untersuchungen würde vorzugsweise Erbrochenes und der Inhalt des Magendarmkanales in Betracht kommen, obgleich auch hier nur geringe Aussicht besteht, von den Digitalstoffen noch etwas vorzufinden.

Über Saponine.

Saponine.

Als Saponine oder Saponinsubstanzen faßt man eine große Zahl von glykosidischen Substanzen zusammen, welche im Pflanzenreiche weit verbreitet vorkommen und die verschiedene chemische, physikalische und besonders physiologische Eigenschaften gemeinsam haben. Sie zeigen insofern eine gewisse Ähnlichkeit mit den Seifen, als ihre wässerigen Lösungen stark schäumen. Viele der Saponinsubstanzen schmecken scharf und kratzend und rufen im gepulverten Zustande starkes Niesen hervor. Sie hindern fein verteilte Stoffe am Absetzen und eignen sich daher zur Unterstützung von Emulsionsbildung. Sie dialysieren sehr unvollständig und lassen sich aus ihren Lösungen zum Teil aussalzen. Mit Ausnahme des Gluko-Alkaloides Solanin, welches stickstoffhaltig ist und alkalisch reagiert, kann man die Saponine chemisch als stickstofffreie Glukoside bezeichnen. Die meisten Saponine reagieren neutral, und nur eine kleinere Anzahl derselben zeigt schwach saure Re-

aktion. Die neutralen Saponine und die Alkalisalze der sauren Saponinstoffe sind im Wasser und in heißem wässerigen Alkohol löslich, in absolutem Alkohol sowie in Äther aber unlöslich. Fällungsmittel für Saponine aus konzentrierter wässeriger Lösung sind Ätzbaryt, wodurch Barytsaponine entstehen, neutrales Bleiacetat und Bleiessig. Durch den letzteren werden alle Saponine gefällt, während Bleizucker nur die sauren Saponine niederschlägt. Viele der Saponinstoffe sind wie die Eiweißstoffe durch Ammoniumsulfat aussalzbar. Konzentrierte Schwefelsäure löst die Saponine mit gelber, allmählich in Rot, bisweilen auch in Violett und Blaugrün übergehender Farbe.

Die große Verbreitung der Saponine im Pflanzenreiche geht schon daraus hervor, daß man bis jetzt in über 50 Pflanzenfamilien mit über 200 mono- und dikotyledonischen Pflanzenarten Saponinsubstanzen aufgefunden hat. Von Pflanzenteilen, welche saponinhaltig sein können, sind es die Wurzeln (Senega, Saponaria), Wurzelknollen (Cyclamen), Rinden (Quillaja, Guajacum), Früchte (Sapindus, Saponaria), Samen (Aesculus, Agrostemma, Thea), Stengel (Dulcamara) und Blätter (Guajacum). Es scheint also kaum einen Teil im Pflanzenorganismus zu geben, in welchem Saponine nicht vorkommen können. Von Pflanzenfamilien, welche reichlichere Mengen von Saponinsubstanzen produzieren, seien die der Sapindaceen, Cariophyllaceen, Colchicaceen, Polygalaceen, Sileneen und Sulanaceen erwähnt. Die Menge an Saponinen, welche in den betreffenden Pflanzenteilen vorhanden sein können, kann eine recht bedeutende sein.

Alle Saponine werden beim Erhitzen ihrer Lösungen mit verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure hydrolytisch gespalten, und zwar in eine Zuckerart und in eine ungiftige, Sapogenin genannte, wasserunlösliche Substanz. Die Sapogenine, die chemisch noch wenig erforscht sind, sind nicht durchweg identisch miteinander.

Die bis jetzt genauer studierten Saponine sind die folgenden:

Digitonin: Im Samen von Digitalis purpurea.

Saponin: In der Wurzel von Saponaria officinalis, zu 4—5%.

Githagin: Im Samen der Kornrade, Agrostemma Githago, zu 6·5%.

Senegin: In der Senegawurzel, der Wurzel von Polygala Senega.

Struthiin: In der levantinischen Seifenwurzel, der Wurzel von Gypsophila Struthium, zu 14%.

Quillaja-Sapotoxin: In der Rinde von Quillaja Saponaria, zu 8·8%.

Sapindus-Sapotoxin: In den Früchten von Sapindus Saponaria.

Sarsaparill-Saponin: In der Sarsaparillwurzel, der Wurzel verschiedener Smilaxarten.

Physiologische Wirkung der Saponine. Die Saponinsubstanzen wirken fast ausnahmslos giftig, und zwar in erheblicherem Grade, wenn sie direkt ins Blut eingeführt werden, als wenn dies nicht der Fall ist. Da sie meist schwer resorbierbar sind, können sie bei innerlicher Darreichung, also per os, in verdünnten Lösungen vom gesunden Menschen in

größeren Mengen vertragen werden, ohne irgendwelche Schädigungen der Gesundheit hervorzurufen. Eine den giftigen Saponinen gemeinsame Eigenschaft ist eine protoplasmareizende Wirkung, die bei größeren Dosen Saponinsubstanz protoplasmaabtötend sein kann. Als solche Protoplasmagifte erweisen sie sich nach verschiedener Richtung hin. In Übereinstimmung hiermit wirken Saponine auch auf Blutkörperchen ein; in der Tat haben *R. Kobert* und seine Mitarbeiter zeigen können, daß defibriniertes, mit physiologischer Kochsalzlösung auf das 100fache verdünntes Blut das feinste und bequemste Reagens auf Saponinsubstanzen ist, indem durch die Saponine Hämolyse eintritt und die Blutlösung lackfarben wird, und zwar ohne Agglutination und ohne Methämoglobinbildung. Je mehr das Blut vom Serum befreit wird, desto ausgesprochener ist die hämolytische Wirkung der Saponinsubstanzen auf die Blutkörperchen. Nach Untersuchungen aus den letzten Jahren wirken die Saponine auf die vom Serum befreiten isolierten Blutkörperchen nur deshalb stärker ein, weil das Blutserum das als Schutzkörper die Hämolyse hindernde Cholesterin enthält. Die hämolytische Wirkung der Saponine kommt allem Anscheine in der Weise zustande, daß dieselben den roten Blutkörperchen das Lecithin der Zellmembran, also den Hauptbestandteil der Hülle, entziehen, indem Lecithin-Saponine gebildet werden. Wie mit Lecithinen können sich die Saponine auch mit Cholesterin zu Cholesterin-Saponinen verbinden. Wenn nun die Affinitäten eines Saponins durch Cholesterin bereits abgesättigt sind, so kann es nicht mehr auf das Lecithin der Membrane der Blutkörperchen einwirken. So kommt es, daß Cholesterin die Hämolyse, welche ein Saponin hervorrufen würde, verhindert und daß somit Cholesterin auf Saponinsubstanzen entgiftend wirkt. *Ransom*[1]) hat diese wichtige Entdeckung gemacht, daß die blutkörperchenlösende Wirkung eines Saponins durch einen Zusatz von Cholesterin aufgehoben wird. Ob diese Entgiftung durch eine chemische Reaktion bedingt ist oder durch Adsorption, also einen physikalischen Vorgang, war zunächst zweifelhaft. *R. Kobert*[2]) sowie *Madsen* und *Noguchi*[3]) vermochten das in Wasser unlösliche Cholesterin in einer wässerigen Saponinlösung aufzulösen und nahmen in dieser physiologisch unwirksamen, also nicht mehr hämolytisch wirkenden Lösung eine labile Saponin-Cholesterinverbindung an. Aber erst *A. Windaus*[4]) hat vor kurzem den Nachweis geführt, daß in der Tat „Saponincholesteride" existieren. Das Digitonin-Cholesterid, $C_{55}H_{94}O_{28} . C_{27}H_{46}O$, kristallisiert in feinen Nadeln aus, wenn man die heißen alkoholischen Lösungen von Digitonin (1 Mol.) und Cholesterin

---

[1]) Deutsche med. Wochenschr. 1901. 194.

[2]) *R. Kobert,* Die Saponine. Stuttgart 1904.

[3]) *Th. Madsen* und *H. Noguchi*, Toxine und Antitoxine. Saponin, Cholesterin. Chem. Zentralbl. 1905. I. 1265.

[4]) *A. Windaus,* Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **42**. 238 (1909).

(1 Mol.) zusammengießt. Dieses Cholesterid entsteht ohne Wasseraustritt; es handelt sich also bei der Reaktion zwischen Digitonin und Cholesterin höchstwahrscheinlich um die Bildung einer Molekularverbindung.

Auch die weißen Blutkörperchen werden von Saponinlösungen, aber erst bei stärkeren Konzentrationen, gelöst. Eine, vielen Saponinen zukommende physiologische Wirkung äußert sich in der Betäubung und Abtötung von Fischen, selbst wenn das Wasser, in dem sie leben, nur 1:200000 Saponinsubstanz enthält *(R. Kobert).*

Nachweis der Saponine.

Hinsichtlich der Isolierung der Saponinsubstanzen aus irgendwelchen Gemischen ist in erster Linie auf deren Löslichkeitsverhalten zu achten. Alle Saponine sind in Wasser löslich, einige derselben auch in Alkohol; in Äther, Benzol, Chloroform und Petroleumäther sind sie so gut wie unlöslich. — Zur Abscheidung der Saponine kann man sich des Bleizuckers oder Bleiessigs bedienen (s. oben), den entstandenen ausgewaschenen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegen, das bleifreie Filtrat auf dem Wasserbade eindunsten und das Saponin aus der konzentrierten Lösung mit absolutem Alkohol und Äther ausfällen.

Konzentrierte Schwefelsäure löst die meisten Saponine mit roter oder gelbroter, allmählich in Violett übergehender Farbe auf.

Mit *Fröhdes* Reagens und mit Vanadinschwefelsäure geben die Saponinsubstanzen verschiedene Färbungen: braune, rotbraune, blaue, grüne und auch violette Färbungen (vgl. Solanin). Kocht man ein Saponin mit verdünnter Salzsäure, so tritt hydrolytische Spaltung ein; infolge der Entstehung eines reduzierend wirkenden Zuckers wird dann *Fehling*sche Lösung beim Erwärmen reduziert.

Über Solanin und Solanidin.

Solanin, $C_{52}H_{93}NO_{12}$, ein alkaloidartiges Glukosid, Glukoalkaloid, ist in der Kartoffelpflanze, Solanum tuberosum und in anderen Solanumarten, wie in Solanum nigrum, Solanum Dulcamare, Solanum Lycopersicum, der Tomate, weit verbreitet. — Auch in Scopoliaarten, wie in Scopolia orientalis und Scopolia atropoides, ist Solanin aufgefunden worden. Das Solanin ist nicht auf alle Teile der Kartoffelpflanze gleichmäßig verteilt; am reichlichsten findet es sich in den beerenartigen Früchten und in den chlorophyllfreien Keimen, wie solche beim Liegen der Kartoffeln im Keller während der Frühlingsmonate hervorschießen. *Schmiedeberg* und *Meyer* fanden, daß im Jänner und Februar 1 *kg* geschälte Kartoffeln 0·024 *g*, 1 *kg* ungeschälte aber 0·044 *g* Solanin enthielten; die Kartoffelschalen als solche hatten 0·71 *g* und die Kartoffelkeime von 1 *cm* Länge sogar 5·0 *g* Solanin in einem Kilogramm. Nach *R. Werk* ist die Entstehung des Solanins auf die Lebenstätigkeit von Bacterium solaniferum zurückzuführen (?).

Solanin kristallisiert in weißen, bei 244° schmelzenden, bitter schmeckenden Nadeln. Es ist in Wasser, auch kochendem, sehr wenig löslich (etwa 1:8000) und wird von 500 Teilen kaltem und 125 Teilen siedendem Alkohol, sowie von zirka 4000 Teilen Äther gelöst. Die Lösungen reagieren schwach alkalisch. Die heiß gesättigten Lösungen des Solanins in Alkohol und in Amylalkohol gelatinieren beim Erkalten. Von Äther, Chloroform und Benzol wird es weder aus saurer noch alkalischer Lösung aufgenommen; heißer Amylalkohol entzieht aber das Solanin sowohl der sauren als auch der mit Natronlauge oder Ammoniak alkalisch gemachten Lösung. Solanin ist eine schwache Base, die sich in Säuren, auch in Essigsäure, leicht auflöst und kristallisierende Salze bildet. — Durch verdünnte Salzsäure oder Schwefelsäure wird Solanin in Solanidin, $C_{40}H_{61}NO_2$, Galaktose und Rhamnose gespalten. Die Hydrolyse tritt in der Kälte langsam, beim Erhitzen rasch ein. Das gebildete salzsaure oder schwefelsaure Solanidin scheidet sich hierbei als schwer lösliches, kristallinisches Pulver aus. Nach *Wittmann* erhält man das Solanidin in guter Ausbeute, wenn man das Solanin mit der zehnfachen Menge 2%iger Schwefelsäure unter Rückfluß kocht, bis sich die Flüssigkeit gelblich färbt und bis das Filtrat bei weiterem Kochen kein schwefelsaures Solanidin mehr abscheidet. Das aus seinem schwefelsauren Salz mit Ammoniak frei gemachte und aus Äther umkristallisierte Solanidin bildet farblose, seidenglänzende, bei 207° schmelzende, in Wasser schwer, in Äther sowie in heißem Alkohol leicht lösliche Nadeln. Solanidin ist eine stärkere Base als das Solanin und gibt mit Säuren meist kristallisierbare, in Wasser schwer lösliche Salze. Solanin und Solanidin sind starke Gifte, die ähnlich wirken wie die echten Saponinsubstanzen (vgl. diese).

Giftwirkung. Bei innerlicher Darreichung ist die Resorption des Solanins meist recht mangelhaft. Als Glukosid übt es eine lokale Wirkung aus und wirkt als saponinähnliche Substanz stark hämolytisch, macht also das Blut lackfarben. Es erfolgt noch vollständige Hämolyse bei einer Verdünnung der Solaninlösung von 1:8300. Bei Einnahme von Solanin erfolgt meist Erbrechen und bei größeren Dosen Gastroenteritis (Magendarmkatarrh). Letztere kommt auch bei intravenöser und subkutaner Injektion von Dosen, welche nicht zu rasch töten, zustande. Nebenbei kann Hämoglobinurie eintreten.

Nachweis des Solanins und Solanidins.

Da Mineralsäuren selbst in sehr starken Verdünnungen Solanin hydrolysieren, muß die Verwendung dieser Säuren bei Auffindung des Solanins selbstverständlich vermieden werden. Nach *E. Schmidt*[1]) zieht man das Untersuchungsobjekt kalt mit weinsäurehaltigem Wasser aus, neutralisiert den abfiltrierten Auszug mit gebrannter Magnesia, dampft auf dem Wasser-

---

[1]) Pharm. Chem., Organischer Teil.

bade zur Trockne ein, kocht den Rückstand mit Alkohol aus und filtriert heiß ab. Ist die Menge des vorhandenen Solanins keine zu geringe, so gelatiniert der alkoholische Auszug beim Erkalten. Andernfalls dunstet man die alkoholische Lösung ein und untersucht den Rückstand auf Solanin. *L. Kobert* läßt Solanin aus alkalischer Lösung mit Isobutylalkohol ausschütteln. — Von den allgemeinen Alkaloidreagenzien gibt nur die Phosphormolybdänsäure mit Solaninlösungen gelbe Fällungen, während das Solanidin, also auch die mit überschüssiger Salzsäure gekochte Solaninlösung, als stärkere Base durch die meisten anderen Alkaloidreagenzien ausgefällt wird.

Spezielle Reaktionen des Solanins und Solanidins.

1. Selensäure-Schwefelsäure[1]) löst Solanin sowie Solanidin mit himbeerroter Farbe; gelindes Erwärmen beschleunigt den Eintritt der Reaktion.

2. Vanadinschwefelsäure[2]) löst Solanin wie Solanidin mit orangegelber, alsbald in Rot und schließlich in Blauviolett übergehender Farbe. Man kann auch die Lösung des Solanins oder Solanidins in Schwefelsäure mit einem Tropfen Vanadinschwefelsäure versetzen.

3. Äthylschwefelsäure[3]) löst Solanin sowie Solanidin mit roter Farbe. Man kann auch die alkoholische Lösung des Solanins oder Solanidins über konzentrierte Schwefelsäure schichten: an der Berührungsfläche der beiden Schichten zeigt sich dann eine rote Zone.

4. Konzentrierte Schwefelsäure löst Solanin mit orangeroter Färbung, die bei längerem Stehen oder gelindem Erwärmen in Braunrot übergeht. — Versetzt man die Lösung des Solanins in konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise mit Bromwasser, so entstehen rote Streifen.

5. *Fröhdes* Reagens löst Solanin mit gelbroter, vorübergehend in Kirschrot und schließlich in Rotbraun übergehende Färbung.

Über Ptomaine.

Ptomaine sind basische, giftige oder nicht giftige, stickstoffhaltige Substanzen, die bei der Fäulnis von Leichenteilen unter dem Einflusse von Bakterien entstehen und häufig in Leichen vorkommen, besonders in solchen Leichenteilen, die schon stark in Verwesung übergegangen sind. Viele Ptomaine zeigen große Ähnlichkeit mit den Alkaloiden, geben beispielsweise wie diese mit den allgemeinen Alkaloidreagenzien Niederschläge, und verschiedene derselben verhalten sich sogar gegen spezielle Alkaloid-

[1]) 1·3 *g* selensaures Natrium, $SeO_4Na_2 . 10H_2O$ + 8 cm^3 Wasser + 6 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure.

[2]) Eine Lösung von 0·1 *g* vanadinsaures Ammonium, VO_3NH_4, in 100 *g* konzentrierter Schwefelsäure.

[3]) 9 cm^3 absoluter Alkohol + 6 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure.

reagenzien wie ganz bestimmte Alkaloide. Die genaue Kenntnis der Ptomaine ist daher für den Gerichtschemiker von größter Bedeutung, indem die Anwesenheit von Ptomainen leicht zu Täuschungen und Trugschlüssen führen kann. — Auch in dem Verhalten gegen Lösungsmittel gleichen diese Fäulnisprodukte den Pflanzenbasen; die einen werden aus weinsaurer, die anderen aus alkalischer Lösung von Äther, wieder andere nur von Amylalkohol oder Chloroform aus alkalischer Flüssigkeit aufgenommen. Die meisten Ptomaine wirken stark reduzierend, führen z. B. Ferricyankalium sofort in Ferrocyankalium über und geben daher mit einem verdünnten Gemisch von Eisenchlorid- und Ferricyankaliumlösung Berlinerblau; auch manche Alkaloide, wie Morphin, gleichen in dieser Hinsicht den Ptomainen.

Die Ähnlichkeit eines Ptomains mit einem bestimmten Pflanzenstoff beschränkt sich häufig nur auf die eine oder die andere Reaktion und erstreckt sich nie auf alle charakteristischen Reaktionen des betreffenden Alkaloids. Um sich daher bei gerichtlich-chemischen Untersuchungen vor Verwechslung von Ptomainen mit Alkaloiden möglichst zu schützen, ist es unbedingt geboten, sämtliche für das vermutete Alkaloid charakteristischen Reaktionen auszuführen und sich nicht etwa mit nur einer Reaktion zu begnügen. — Durch Feststellung der physiologischen Wirkung der Substanz ist die chemische Untersuchung zu ergänzen; denn gerade in physiologischer Hinsicht unterscheiden sich häufig die Fäulnisprodukte sehr wesentlich von den chemisch-ähnlichen Pflanzenbasen. Es sind bis jetzt Ptomaine beobachtet und beschrieben worden, die mit Coniin, Nikotin, Strychnin, Kodein, Veratrin, Delphinin, Atropin, Hyoscyamin, Morphin und Narcein gewisse Ähnlichkeiten zeigten. Ein dem Morphin gleichendes Fäulnisprodukt ist von *Selmi* beschrieben worden; dasselbe wurde weder aus saurer noch alkalischer Lösung von Äther aufgenommen, wohl aber wurde es der mit Natronlauge oder Ammoniak alkalisch gemachten Lösung durch Amylalkohol entzogen. Es machte aus Jodsäure Jod frei, gab aber die für Morphin allein charakteristischen Reaktionen, nämlich die *Husemann*sche, *Pellagri*sche und die Ferrichlorid-Reaktion, nicht.

Um in solchen Fällen ein unzweideutiges Resultat zu erhalten, ist, wenn irgend möglich, die Reindarstellung des Alkaloids anzustreben. Gelingt diese, so kann die Natur des Giftes meist unzweifelhaft festgestellt werden.

Die Bereitung der Reagenzien.[1]

A. Die allgemeinen Alkaloidreagenzien.

Eine Reihe von Reagenzien, die man allgemeine Alkaloidreagenzien oder auch Gruppenreagenzien nennt, gibt mit den Lösungen der

[1]) Nach *W. Autenrieth*, „Die Auffindung den Gifte", IV. Aufl. 1909.

meisten Alkaloide und ihrer Salze charakteristisch gefärbte, amorphe, oder kristallinische, unlösliche oder schwer lösliche Niederschläge. — Diese Reagenzien fällen freilich nicht ausschließlich Alkaloidsalzlösungen aus sondern verschiedene derselben, wie Gold-, Platin- und Quecksilberchlorid, Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure reagieren auch mit Ammoniak und vielen einfachen Ammoniakderivaten in ähnlicher Weise wie mit Alkaloiden. Dieses hat seinen Grund darin, daß die Alkaloide selbst Ammoniakabkömmlinge sind, nämlich meistens tertiäre oder sekundäre Basen. Auch Eiweißstoffe, Albumosen, Peptone, Kreatinin und die Purinbasen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin geben mit den meisten Alkaloidreagenzien Niederschläge. Die allgemeinen Alkaloidreagenzien könnte man demnach auch als Reagenzien auf „Stickstoffbasen“ bezeichnen.

Die allgemeinen Alkaloidreagenzien wendet man besonders dann an, wenn man feststellen will, ob überhaupt ein Alkaloid oder sonst ein basischer Körper vorhanden ist oder nicht. Hinterläßt der Ätherauszug der wässerig-alkalischen Lösung beim Arbeiten nach dem Verfahren von *Stas-Otto* nur einen geringen Verdunstungsrückstand, so untersucht man diesen zunächst auf sein Verhalten gegen die allgemeinen Alkaloidreagenzien, ehe man auf die einzelnen Alkaloide prüft. Zur Ausführung dieser Reaktionen löst man eine Probe des fraglichen Verdunstungsrückstands in stark verdünnter Salzsäure oder Schwefelsäure auf, verteilt die filtrierte Lösung auf einige Reagenzgläschen und läßt zu jeder Probe ein empfindlicheres Alkaloidreagens zutropfen. Bei Vorhandensein eines Alkaloids oder irgend einer anderen basischen Substanz entstehen bei allen oder fast allen Proben deutliche Niederschläge oder wenigstens starke Trübungen.

Die hauptsächlichsten Alkaloidreagenzien sind die folgenden:

Goldchlorid, eine wässerige Lösung 1:30, bewirkt weiße, gelbe oder braune, amorphe oder kristallinische Niederschläge, die zum Teil unter Abscheidung von metallischem Gold leicht zersetzt werden.

Platinchloridchlorwasserstoffsäure, kurz **„Platinchlorid“** genannt, eine wässerige Lösung, etwa 1:20, erzeugt gelblichweiße bis gelbe, meistens körnig kristallinische Niederschläge, die fast immer dem Platinsalmiak $PtCl_6(NH_4)_2$ analog zusammengesetzt sind.

Quecksilberchlorid, wässerige Lösung 1:20, gibt weiße bis gelbliche, meistens amorphe, allmählich kristallinisch werdende Niederschläge.

Jodlösung, Jodjodkaliumlösung. *Wagners* Reagens, eine Auflösung von 5 Teilen Jod und 10 Teilen Jodkalium in 100 Teilen Wasser, ruft braune, meist flockige Niederschläge hervor.

Kadmiumjodid-Jodkalium. *Marmés* Reagens. — Man löst 20 *g* Jodkalium in der gleichen Menge siedenden Wassers auf, fügt 10 *g* Jodkadmium dazu und verdünnt diese Lösung mit Wasser auf 100 cm^3. — *Marmés* Reagens gibt mit den schwefelsauren Lösungen der meisten Alka-

loide, auch bei starker Verdünnung, weiße oder gelbliche, amorphe, später kristallinisch werdende Fällungen, die im Überschusse des Reagenses, sowie in Alkohol löslich sind.

Quecksilberjodid-Jodkalium — *Mayers* Reagens —, eine Auflösung von 1·35 *g* Quecksilberchlorid und 5 *g* Jodkalium in 100 *g* Wasser, gibt mit den salzsauren Lösungen der meisten Alkaloide weiße oder gelbliche Niederschläge, die amorph sind, aber häufig allmählich kristallinisch werden.

Wismutjodid-Jodkalium. — *Dragendorffs* Reagens. Nach *Kraut*[1]) bereitet: Durch Auflösen von 80 *g* Wismutsubnitrat in 200 *ccm* Salpetersäure von 1·18 spez. Gew. (30% HNO_3) und Eingießen dieser Lösung in eine konzentrierte Lösung von 272 *g* Jodkalium in wenig Wasser. Nach dem Auskristallisieren des Salpeters verdünnt man die Flüssigkeit mit Wasser auf einen Liter.

Wismutjodid-Jodkalium ruft in den schwefelsauren Lösungen vieler Alkaloide schön orangerote, meistens amorphe Niederschläge hervor. Durch Schütteln dieser Niederschläge mit Natronlauge und Soda können die Alkaloide meistens unverändert und häufig fast quantitativ wieder gewonnen werden.

Zinkjodid-Jodkalium. Man löst 10 *g* Jodzink und 20 *g* Jodkalium in 100 *g* Wasser auf.

Phosphormolybdänsäure. — *Sonnenscheins* Reagens.

a) Man sättigt eine wässerige Lösung von Natriumkarbonat mit reiner Molybdänsäure, fügt auf 5 Teile der Säure 1 Teil kristallisiertes Dinatriumphosphat ($PO_4Na_2H + 12H_2O$) hinzu, verdampft dann zur Trockne, schmilzt den Rückstand in einem Porzellantiegel und löst die erkaltete Schmelze in Wasser auf. Aus 1 Teil Rückstand bereite man 10 Teile Lösung. Die abfiltrierte Flüssigkeit versetzt man noch mit so viel Salpetersäure, daß sie goldgelb gefärbt ist.

b) In Ermanglung freier Molybdänsäure kann man auch die salpetersaure Ammoniummolybdatlösung, wie sie zum Nachweis der Phosphorsäure Verwendung findet, mit Natriumphosphatlösung bei etwa 40° vollständig ausfällen. Der hierbei erhaltene, gelbe Niederschlag wird gut ausgewaschen, in Wasser verteilt und mit einer konz. Natriumkarbonatlösung bis zur vollständigen Auflösung erwärmt. Diese Lösung dampft man zur Trockne ein, glüht den Rückstand bis zur vollständigen Verjagung des Ammoniaks, befeuchtet ihn, wenn Reduktion eingetreten ist (Blau- bis Schwarzfärbung), mit Salpetersäure und glüht wiederum. Diesen Rückstand löst man in heißem Wasser unter Zusatz von Salpetersäure auf, so daß diese stark vorherrscht. Aus 1 Teil Rückstand stellt man sich 10 Teile Lösung her. Die goldgelbe Lösung muß, gegen Ammoniakdämpfe geschützt, aufbewahrt werden.

---

[1]) *K. Kraut*, Jodwismutverbindungen organischer Basen. Annalen d. Chemie. **210**. 310 (1881) und *E. Jahns*, Über die Anwendung des Kaliumwismutjodids zur Darstellung organischer Basen. Archiv d. Pharmazie. **235**. 151 (1897).

Phosphormolybdänsäure gibt mit den schwefelsauren Lösungen der meisten Alkaloide gelblich gefärbte, amorphe Niederschläge, die manchmal durch Reduktion der Molybdänsäure zu Molybdänoxyd nach einiger Zeit eine grünliche bis bläuliche Färbung annehmen.

Phosphorwolframsäure. — *Scheiblers* Reagens.

Man versetzt die wässerige Lösung von wolframsaurem Natrium mit wenig 20%iger Phosphorsäure: gibt ähnlich aussehende Niederschläge wie das vorhergehende Reagens. Über die Bereitung von kristallisierter Phosphorwolframsäure vergl. *Drechsel*[1]) und *Winterstein.*[2])

Gerbstofflösung, 5%ige, wässerige Lösung von Tannin, bewirkt weißliche oder gelbliche, flockige Niederschläge, die in Salzsäure teilweise löslich sind. Durch Behandeln dieser Gerbstoffniederschläge mit Blei- oder Zinkkarbonat, Eindampfen und Extraktion des Rückstandes mit Äther, Alkohol oder Chloroform können die Alkaloide zum Teil unverändert wieder gewonnen werden.

Pikrinsäure: eine konzentrierte, wässerige Auflösung der Pikrinsäure, erzeugt gelbe, kristallinische oder amorphe, bald kristallinisch werdende Niederschläge.

Pikrolonsäure. Man verwendet eine $^1/_{10}$ n-alkoholische Lösung, die also $^1/_{10}$ *g* $C_{10}H_8N_4O_5 = 26·4$ *g* feste Pikrolonsäure im Liter Alkohol enthält. Diese Lösung gibt mit den meisten Alkaloiden schwer lösliche, kristallisierende, gelb bis rot gefärbte, Pikrolonate genannte Salze. Pikrolonsäure verhält sich gegen Basen wie eine einbasische Säure.[3])

B. Sonstige Reagentien und Lösungen.

Erdmanns Reagens: salpetersäurehaltige Schwefelsäure. 20 *cm*³ reine konz. Schwefelsäure werden mit 10 Tropfen einer Mischung aus 6 Tropfen konz. Salpetersäure und 100 *cm*³ Wasser versetzt.

Fröhdes Reagens: eine Auflösung von Molybdänsäure in Schwefelsäure. 5 *mg* Molybdänsäure oder Natriummolybdat werden in 1 *cm*³ heißer, reiner konz. Schwefelsäure gelöst. Diese Lösung, die farblos sein soll, ist nicht lange haltbar.

Konzentriertes *Fröhde*sches Reagens enthält auf 1 *cm*³ konz. Schwefelsäure 0·01 *g* Molybdänsäure oder deren Natriumsalz.

---

[1]) *E. Drechsel,* Einfache Methode zur Darstellung einiger komplexen anorganischen Säuren. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **20**. 1452 (1887).

[2]) *E. Winterstein,* Über die Herstellung reiner Phosphorwolframsäure. Chemiker-Zeitung 1898. 539.

[3]) *L. Knorr,* Über den Amidoäthylalkohol. Berichte d. Deutsch. chem. Ges. **30**. 909 (1897); *H. Matthes* und *O. Rammstedt,* Die Verwendbarkeit der Pikrolonsäure zur quantitativen Bestimmung einiger Alkaloide. Zeitschr. f. analyt. Chem. **46**. 565 und Archiv d. Pharmazie. **245**. 112 (1907).

Fehlingsche Lösung. Man hält zweckmäßig eine Kupfersulfat- und eine alkalische Seignettesalzlösung getrennt vorrätig.

1. Die Kupfersulfatlösung enthält in 500 *cm*³ Lösung 34·64 *g* reines kristallisiertes Kupfersulfat ($CuSO_4 + 5H_2O$).

2. Die alkalische Seignettesalzlösung. Man löst 173 *g* Seignettesalz ($C_4H_4O_6KNa + 4H_2O$) und 50 *g* Ätznatron in Stangen in heißem Wasser auf und verdünnt diese Lösung nach dem Erkalten mit Wasser auf 500 *cm*³.

Diese beiden Lösungen, zu gleichem Volumen gemischt, bilden die Fehlingsche Lösung, die zweckmäßig erst vor dem Gebrauche hergestellt wird. — Eine vorrätig gehaltene Fehlingsche Lösung hat man vor der Verwendung stets auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen! Sie ist unbrauchbar, sobald sie beim Kochen für sich einen Niederschlag von Kupferoxydul ausscheidet.

Formalinschwefelsäure, *Marquis* Reagens.[1]) 2—3 Tropfen Formaldehydum solutum — Formalin — werden vor dem Gebrauche mit 3 *cm*³ reiner konzentrierter Schwefelsäure gemischt.

Günzburgsches Reagens: Phloroglucin-Vanillinlösung.

1 Teil Phloroglucin und 1 Teil Vanillin werden in 30 Teilen Alkohol gelöst. — Dieses Reagens dient zum Nachweise freier Mineralsäuren, besonders freier Salzsäure; freie organische Säuren reagieren nicht mit dem *Günzburg*schen Reagens.

Hünefeldsche Lösung. Man versetzt 15 *cm*³ älteres, einige Zeit der Luft und dem Licht ausgesetzt gewesenes Terpentinöl, das aber Guajaktinktur nicht direkt bläuen darf oder 15 *cm*³ 3—5%iges, säurefreies Wasserstoffsuperoxyd mit 25 *cm*³ Alkohol, 5 *cm*³ Chloroform und 1·5 *cm*³ Eisessig. Diese Lösung dient zum Nachweis von Blut.

Jodsäurelösung, 10%ige, wässerige Lösung von Jodsäure (JO_3H).

Magnesiamischung, auch **Magnesiamixtur** genannt. 11 *g* kristallisiertes Magnesiumchlorid ($MgCl_2 + 6H_2O$) und 14 *g* Ammoniumchlorid werden zusammen in 130 *g* Wasser gelöst und 70 *g* Ammoniakflüssigkeit (0·96 sp. G. = 10% NH_3) zugesetzt. Diese Mischung soll klar sein. — Sie dient zum Nachweis der Arsensäure und Phosphorsäure.

Mandelins Reagens. Vanadin-Schwefelsäure. 1 Teil vanadinsaures Ammonium wird in 200 Teilen reiner konz. Schwefelsäure gelöst.

Millons Reagens. Man löst 1 Teil Quecksilber in 1 Teil kalter, rauchender Salpetersäure auf, verdünnt hierauf mit dem doppelten Volumen Wasser und gießt nach mehrstündigem Stehen die klare Lösung vom Ungelösten ab.

---

[1]) *R. Kobert*, Zum Nachweis des Morphins und seiner Derivate. Apotheker-Zeitung. **14**. 259 (1899) und *H. Linke*, Über das Verhalten der mit Formaldehyd versetzten Schwefelsäure zu einigen organischen Körpern, speziell zu den Alkaloiden. Berichte d. Deutsch. pharm. Ges. **11**. 258 (1901).

Nesslers Reagens. 10 *g* Quecksilberjodid (HgJ_2) + 5 *g* Kaliumjodid + 20 *g* Ätznatron + 100 *g* Wasser. Das Quecksilberjodid wird in einem Porzellanmörser mit wenig Wasser verrieben, dann in eine Flasche gespült und das Kaliumjodid zugesetzt; das Ätznatron wird in dem Reste des Wassers gelöst und die erkaltete Lauge mit der Quecksilberjodid-Jodkaliumlösung gemengt. Die durch Absetzen geklärte Flüssigkeit wird in kleineren Flaschen im Dunkeln aufbewahrt.

Selenigsäure-Schwefelsäure, *Mecke*sches Reagens.[1]) Eine Lösung von 0·5 *g* seleniger Säure in 10 *g* reiner konz. Schwefelsäure.

Zinnchlorürlösung — Solutio Stanni chlorati des „Arzneibuches". — 5 Teile kristallisiertes Zinnchlorür werden mit 1 Teil Salzsäure zu einem Brei angerührt und letzterer mit trockenem Chlorwasserstoffgas gesättigt. Die hierdurch erzielte Lösung wird nach dem Absetzen durch Asbest filtriert. — Blaßgelbliche, lichtbrechende, stark rauchende Flüssigkeit von mindestens 1·9 spez. Gewicht. Diese Lösung dient zum Nachweise des Arsens (*Bettendorff*sche Arsenprobe).

Die Zinnchlorürlösung ist der größeren Haltbarkeit wegen in kleinen, mit Glasstopfen verschlossenen, vollständig gefüllten Flaschen aufzubewahren.

---

[1]) *Mecke*, Ein neues Reagens auf Alkaloide. Zeitschr. f. öffentliche Chemie. 5. 351 (1899).

Die Gefäßnaht und Massen-Transplantationen.

Von **E. S. London**, St. Petersburg.

Vorbemerkung.

Gegenstand meines Aufsatzes in Band II des vorliegenden Handbuches bildete die Beschreibung derjenigen Operationen, welche beim Studium biologisch-chemischer Erscheinungen bereits verschiedenartig angewendet wurden und bereits gegeben sind die Fragen, für deren Klärung obige Operationen einzeln am geeignetsten erscheinen.

Anders verhält es sich mit den in vorliegender Schrift besprochenen Operationen. Selbe sind bisher ausschließlich zwecks klinischer Chirurgie ausgebaut und zum Teil schon in die Praxis aufgenommen worden. Was dagegen ihre Verwertung für biologisch-chemische Untersuchungen betrifft, so liegt selbe im Bereiche der Perspektive und sind die einzelnen Operationen erst noch anzumerken.

Als Ausgangspunkt aller im vorliegenden Aufsatze zur Besprechung gelangenden Operationen ist zu betrachten, die in letzter Zeit emporgekommene Gefäßnaht, mit deren Besprechung wir auch beginnen wollen.

Allgemeine Bemerkungen.

1. Aseptische und antiseptische Maßregeln.

Bei den hier zu behandelnden Operationen ist die Asepsis von größter Bedeutung. Im allgemeinen soll die Regel gelten, daß die Haut an der Operationsstelle antiseptisch, die Operation aber selbst aseptisch zu behandeln ist.

Die Haut wird gewaschen, mit Spiritus sapon. kalini gereinigt, mit sterilem Wasser nachgewaschen, dann mit Benzin behandelt und endlich mit Alkohol gewaschen.

Die Hände werden gründlich mit Spiritus sap. kal. vermittelst einer Bürste gereinigt und dann mit sterilem Wasser und endlich mit Alkohol gewaschen.

Die Instrumente und die Seide werden in Vaselinum liquidum bis 120° C erhitzt und in demselben Gefäß aufbewahrt.

Für das Übrige gelten die allgemeinen chirurgischen Regeln.

2. Instrumentarium und Seide.

Außer den gewöhnlichen chirurgischen Instrumenten muß man für die hier beschriebenen Operationen noch spezielle Appertinenzen haben, und zwar:

a) Nadeln:

α) feinste Nähnadeln (0·2 *mm* breit und 15 *mm* lang) (Fig. 172),

β) gebogene Nadeln (Fig. 173);

Die Nähnadeln können von der Firma *Kirby* (London Nr. 16) bezogen werden.

b) Nadelhälter Mathieu (Fig. 176) oder Langenbeck;

c) Feinste anatomische Pinzetten (Fig. 175);

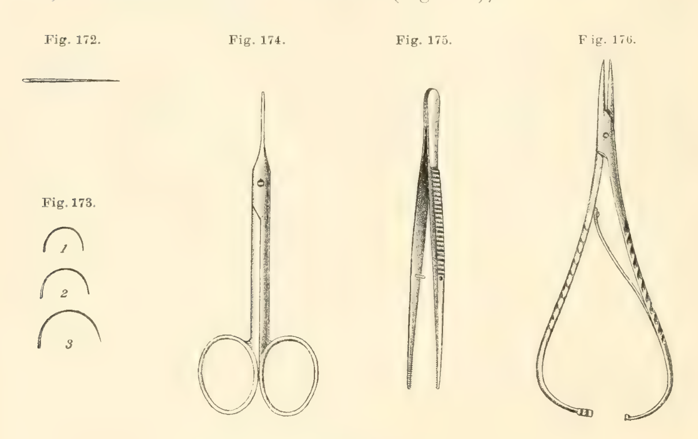


Fig. 172. Fig. 173. Fig. 174. Fig. 175. Fig. 176.

d) Feinste Scheere (Fig. 174);

e) Klemmen:

α) mit ausgezeichnetem Erfolg werden die *Höpfner*schen Klemmen gebraucht, deren Branchen mit passendem Gummidrain überzogen werden und zur Verhinderung des Abgleitens mit Tupfermulls umhüllt,

β) besonders für tiefliegende Gefäße, wie z. B. in der Bauchhöhle, eignen sich gewöhnliche, mit Gummirohr überzogene Gefäßpinzetten (Fig. 183—188);

f) Nahtmaterial:

Die allerfeinste Seide (wie z. B. „extrafein" der Firma *Pearsall* oder Lyon, *Lepine*, 14 place des Terreaux) wird zunächst ½ Stunde in Wasser aufgekocht und dann in steriles Paraffinum liq. übertragen.

I. Die Gefäßnaht.

1. Historisches. Die schon längst aufgeworfene Frage über die seitliche Arteriennaht wurde zuerst von *Jassinowsky*[1]) gelöst. Für das Gelingen einer Arteriennaht war eines der Haupterfordernisse *Jassinowskys* die Schonung der Intima; die Naht sollte nur Adventitia und Media fassen. *Dörfler*[2]) konnte aber an Hunden zeigen, daß die Schonung der Intima keineswegs die Hauptbedingung für den Erfolg der Operation ist.

Im Jahre 1897 beschrieb *Murphy*[3]) seine Invaginationsmethode zur Anwendung einer zirkulären Naht der Blutgefäße, welche dann weiter durch *Reinsholm*[4]) etwas modifiziert wurde. Die Methode besteht darin, daß das proximale in das distale Ende durch 2—3 doppelt armierte Fäden, die nur Adventitia und Media fassen, beim Knoten invaginiert werden.

Im Jahre 1900 veröffentlichte *Payr*[5]) seine neue Methode zur Anlegung einer zirkulären Naht, welche darin besteht, daß die Gefäßabschnitte mittelst einer resorbierbaren Magnesiumprothese vereinigt werden.

Endlich gaben im Jahre 1902 *G. Jensen*[6]) und *Alexis Carrel*[7]) unabhängig voneinander eine neue Methode an zur zirkulären Vereinigung durchtrennter Gefäße.

Es sind noch einige andere Methoden vorgeschlagen worden (*Horoch*[8]), *Gluck*[9]), *Briean*[10]) und *Jaboulay*[11]). Es haben sich aber nur 2 Methoden brauchbar erwiesen: die Prothesenmethode *Payrs* und in erster Linie die zirkuläre Naht von *A. Carrel*.

---

[1]) *A. Jassinowsky*, 1. Die Arteriennaht. In.-Diss. Dorpat 1889; 2. Ein Beitrag zur Lehre der Gefäßnaht. Arch. f. klin. Chir., Bd. 42. S. 816.

[2]) *Dörfler*, Über Arteriennaht. Beiträge zur klinischen Chirurgie. 1899. Bd. 25. S. 781.

[3]) *Murphy*, Resection of arteries and veines injured in continuity, End-to-End Suture. New York Medical Record. 1897. p. 73.

[4]) *Reinsholm*, Die verschiedenen Methoden f. zirkuläre Vereinigung abgeschnittener größerer Arterien- und Venenstämme. Nordiskt med. Arkiv. 1903. Bd. 35. S. 1. 38. 39. Ref. *Hildebrands* Jahresbericht über die Fortschritte der Chirurgie. 1904. S. 159.

[5]) *Payr*, Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nervennaht. Archiv f. klin. Chirurgie. 1900. Bd. 62. S. 67; 1901. Bd. 64. S. 726; 1904. Bd. 72. S. 32; 1908. Jg. 802.

[6]) *Georg Jensen* (Kopenhagen), Über zirkuläre Gefäßsutur. Arch. f. klin. Chirurgie. 1903. Bd. 69. S. 938.

[7]) *Alexis Carrel*, La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscéres. Lyon médical. 1902. T. 98.

[8]) *Horoch*, Die Gefäßnaht. Allg. Wiener med. Zeitung. 1888. Nr. 12.

[9]) *Gluck*, 1. Über neuere Operationen an Blutgefäßen. Arch. f. Kinderheilkunde. 1897. Bd. 22. S. 374; 2. Die moderne Chirurgie des Zirkulationsapparates. Berliner Klinik. 1898. H. 120; 3. Probleme und Ziele der plastischen Chirurgie. 78. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte zu Stuttgart. Zentralbl. f. Chirurgie. 1906.

[10]) *Briean* et *Jaboulay*, Recherches expérimentales sur la suture et la greffe artérielles. Lyon médical. 1896. p. 97.

[11]) *Jaboulay*, Chirurgie des artères. La semaine médicale. 1902. p. 405.

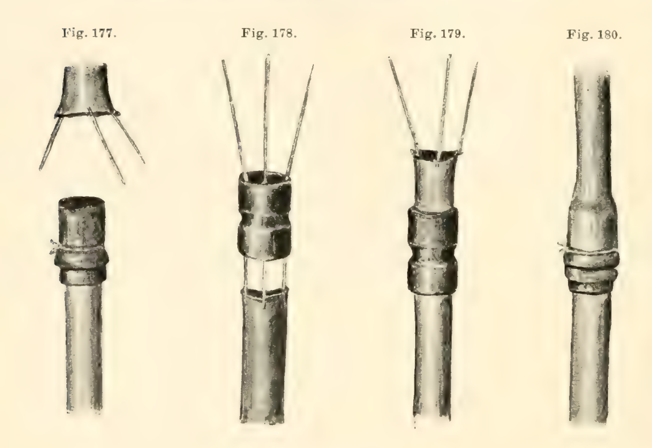
A. Die Prothesenmethode.

1. Prinzip der Methode. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die (extravasale) Prothese dicht in die Lichtung des Gefäßes hineinkommt und daß Intima mit Intima in mehr oder weniger breite Verbindung tritt.

2. Ausführung:

a) Das zentrale Ende des Gefäßrohres wird mittelst einer betreffenden, feinen Hakenschieberpinzette durch einen außerordentlich dünnwandigen — 0·3—0·5 *cm* langen Hohlzylinder aus Magnesium hindurchgezogen bis $^1/_4$—1 *cm* (je nach der Größe des Lumens) über den peripheren Rand des Zylinders (Fig. 177 u. 178).

Fig. 177. Fig. 178. Fig. 179. Fig. 180.



b) Der vorspringende Gefäßabschnitt wird über den Zylinder mit der Intima nach außen umgekrempelt (Fig. 179) und durch eine Seidenligatur an der Nahtstelle befestigt (Fig. 180).

c) Das mit dem Magnesiumring armierte Gefäßende wird in das freie periphere Gefäßende invaginiert und durch eine zweite Ligatur der Delle entsprechend um das Invaginans befestigt.

3. Anwendung. Diese Methode läßt sich nur bei verhältnismäßig größeren Gefäßen mit gewissem Erfolg verwenden. Sie soll dann den Vorzug haben, daß eine Blutung nicht leicht zustande kommt. Jedenfalls wird bei dieser Methode stets die Gefäßlichtung bedeutend eingeengt und desto mehr, daß sich noch außerdem häufig Falten bilden, die an und für sich oder durch Thrombosebildung das Gefäßrohr verschließen können. Ein Gefäß unter 3 *mm* füllt die Prothese schon derartig aus, daß von einer normalen Zirkulation keine Rede mehr sein kann.

B. Die Haltfädenmethode.

§ 1.

Diese von *A. Carrel* eingeführte Methode soll hier in der Weise geschildert werden, wie selbe in Verfassers Laboratorium ausgeführt wird. Die Eigentümlichkeit dieser Verfahrungsart besteht erstens darin, daß statt *Florescos*[1]) 4 und *Carrels* 3 Haltefäden (Fig. 181 und 182) nur 2 (Fig. 184 bis 188) angelegt werden (*A. J. Morozowa*[2]), was die Technik vereinfacht; zweitens, daß bei kleinen Venen zwecks besserer Orientierung provisorische Fäden angebracht werden und drittens, daß die Haltefäden an den Venen

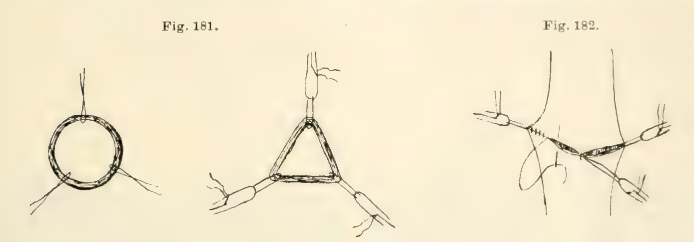


Fig. 181. Fig. 182.

so angelegt werden, daß die Gefäßränder beim Knoten der Fäden nach außen sich krempeln.

α) Ausführung der Operation.

1. Anlegung der Orientierungsfäden. Dieser Moment kommt nur dann in Betracht, wenn es sich um Venen handelt, weil die letzteren hauptsächlich bei geringem Kaliber nach dem Durchschneiden stark retrahiert werden und so zusammenfallen, daß ihre Lichtung nur mit großen Schwierigkeiten herauszufinden ist.

Die Operation beginnt mit Freilegen und provisorischem Abklemmen der zu vereinigenden Gefäßabschnitte mittelst *Höpfner*schen oder speziell konstruierten Klemmen (Fig. 183–188). Bevor man das Gefäß durchschneidet, werden an zwei symmetrischen Stellen je 2 Seitenfäden 1—2 *mm* weit von der angemerkten Schnittlinie durch die Adventitia-Media durchgeführt. Soll nur von einem Gefäßende im weiteren Gebrauch gemacht werden, so genügt es, an der betreffenden Seite die Orientierungsfäden anzulegen.

2. Anlegung der Haltfäden. An zwei symmetrischen Stellen der zu vereinigenden Gefäßränder werden die Fäden nach Durchschneiden der Adventitia etwa 1½ *mm* vom Rande entfernt durch die ganze Dicke der Wand, wie aus der Fig. 183 ersichtlich, gelegt. Bei Venen von geringem

---

[1]) *Floresco*, Transplantation des Organes. Journ. de physiol. et pathol. générale. 1905. T. 7. p. 27.

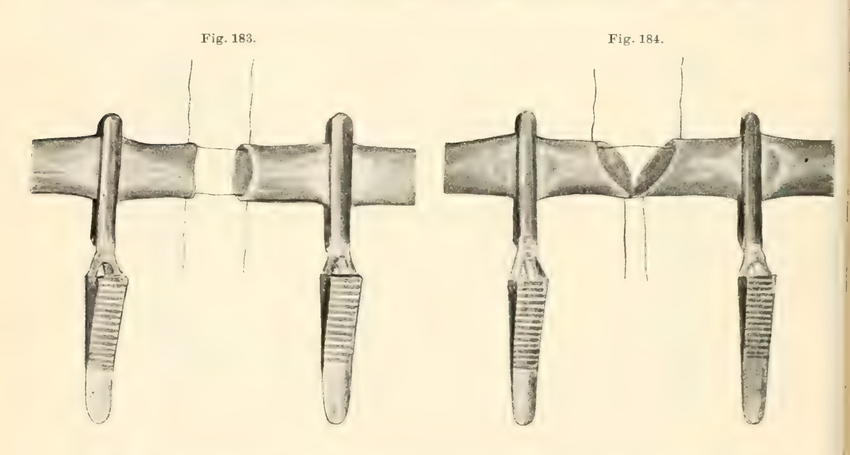
[2]) *A. J. Morozowa*, Zur Lehre von der Gefäßnaht. Dissertation (russisch). 1909.

Kaliber werden die Haltfäden in folgender Weise angelegt. Der mit zwei Nadeln armierte Faden wird zunächst in die eine Gefäßwand (zwischen den Orientierungsfäden, wenn solche angelegt worden waren) etwa 2 *mm* vom Rand entfernt von innen nach außen geführt und dann randwärts wieder von außen nach innen ca. 1 *mm* vom Rand.

Man benutzt am besten gerade Nadeln, sogar in der Tiefe wenn möglich, da sie weniger die Gefäßwand zerren, als die krummen Nadeln. Am zweiten Gefäß werden die Stiche in derselben Weise mit der zweiten Nadel gemacht. Die Fäden werden geknotet (Fig. 184), wobei die Gefäßränder ausgekrempelt werden, wenn nötig, mittelst feiner anatomischer Pinzetten.

3. Zusammennähen der Gefäßränder. Der Assistent spannt vermittelst der 2 Haltfäden die Gefäßränder an (Fig. 185) und der Operateur

Fig. 183. Fig. 184.



legt mit der rechten Hand eine fortlaufende Naht an den umgekrempelten Gefäßrändern an, wobei er mit der linken Hand den Nahtfaden jedesmal vor dem Durchstechen der Nadel möglichst aufzieht; dadurch wird das Mitgreifen der unterliegenden Gefäßrand verhindert. Durch die Anspannung der 2 Haltfäden und das Aufziehen des Nahtfadens bildet sich ein Dreieck mit einer fortrückenden Spitze (Fig. 185).

Es ist wichtig, daß der Operateur die Gefäßränder gut sieht. Ist das nicht der Fall, so geschieht es, wenn der Assistent mit dem Goldfinger der entsprechenden Hand die betreffende Gefäßwand ein wenig andrückt.

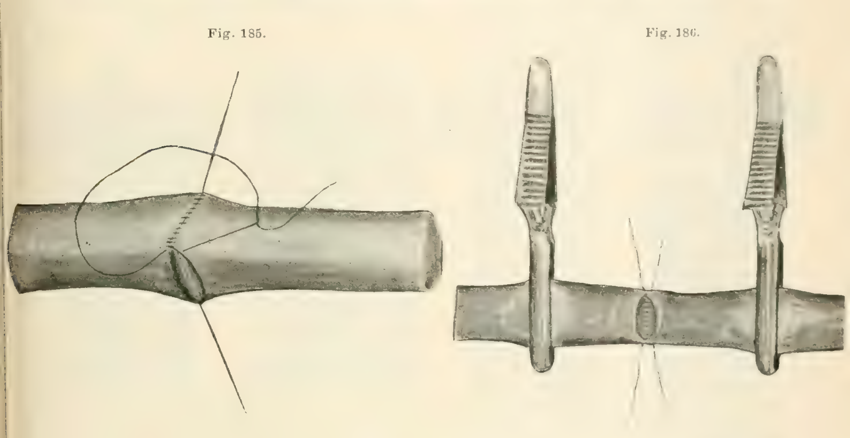
Die Stiche müssen möglichst nahe voneinander angelegt werden, damit die Gefäßlichtung nicht verengt wird.

Die ganze Zirkumferenz wird mit einem einzigen Faden fortlaufend genäht, wozu die Haltfäden, wenn die vorderen Gefäßränder vereinigt sind, vom Assistenten umgekehrt werden (Fig. 186).

Carrel bringt 3 Stützfäden in gleichen Abständen an der Zirkumferenz des Gefäßes an und verwandelt durch Zug an jeden dieser Fäden die runde Zirkumferenz der Gefäßstümpfe in ein gleichschenkeliges Dreieck (Fig. 181 und 182).

4. Herstellung des Blutstromes. Da bei der Entfernung der Klemmen gewöhnlich aus einigen Stichkanälen eine Blutung entsteht, so wird das Gefäß an der Nahtstelle noch vor dem Abnehmen der Klemmen mittelst zwei Mulltupfer zwischen zwei Fingern leicht komprimiert. Nach 2—4 Minuten werden die Mulltupfer vorsichtig entfernt. Die Blutung ist regelmäßig zum Stillstand gekommen. Sollte es jedoch der Fall nicht sein, so legt man an den blutenden Stellen Hilfsnähte an.

5. Weitere Versorgung der Gefäßnaht. Das umliegende Bindegewebe wird zusammengenäht, um eine künstliche Scheide zu bilden. Dann


Fig. 185. Fig. 186.

werden die umliegenden Muskeln zusammengenäht. Endlich kommt die Hautnaht.

β) Technische Bemerkungen.

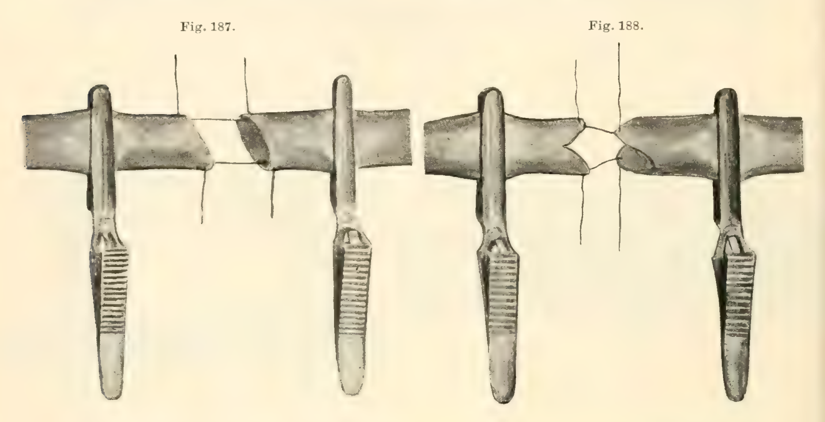
1. Nach einigen Autoren (*R. Stich, M. Makkas* und *C. E. Dowman*[1]) ist bei der Vorbereitung des Gefäßes eine subtile Präparation des periadventitiellen Gewebes auf längere Strecken zu vermeiden, weil dabei häufig Nachblutungen aus versehentlich durchschnittenen feinen Seitenästen entstehen. Es genügt, das Gefäß aus seiner Scheide herauszulösen und an der Nahtstelle das periadventitielle Gewebe zu beseitigen. Letzteres gelingt in der Weise, daß man nach Durchschneidung des Gefäßes das periadventitielle Gewebe am Stichrande mit einer Pinzette faßt, zieht möglichst

[1]) *R. Stich, M. Makkas* und *C. E. Dowman*, Beiträge zur Gefäßchirurgie; Beiträge zur klin. Chir. 1907. Bd. 53. S. 113.

weit über den Querschnitt hinaus und kappt mit einer Schere am selben (nach *R. Stich*).

2. Die Haltfädennaht gelingt desto leichter, je breiter die Gefäßlichtung ist. Bei Gefäßen kleinen Kalibers (ca. 1 *mm*) stößt man auf große technische Schwierigkeiten und schon die geringste Lumenverengerung verursacht Mißlingen der Operation. Aus diesem Grunde versuchte Verf. in Gemeinschaft mit *N. A. Dobrowolskaja* das Verfahren zu vervollkommnen.

Da die Ursache des Mißlingens in der Kleinheit des Schnittes liegt, so lag der Gedanke nahe, denselben vergrößern zu suchen. Es wurden also schräge Schnitte (Fig. 187) und Festonschnitt (Fig. 188) versucht. Bei den ersteren werden die Gefäßenden so vereinigt, wie sie getrennt wurden, bei den letzteren werden sie um 90° umgedreht (Fig. 188). Es wurden da-


Fig. 187. Fig. 188.

bei gute Erfolge erzielt. Die Technik muß aber noch weiter ausgearbeitet werden.

3. Aufbewahren der zu transplantierenden Gefäße. Nach *A. Carrels*[1]) neueren Untersuchungen ist die beste Aufbewahrungsart der Gefäße folgende. Man legt das zu konservierende Stück in Vaselin und stellt in Eisschrank bei einer Temperatur, die nur sehr wenig über den Gefrierpunkt liegt.

C. Folgen der Gefäßnaht.

a) Makroskopische Befunde.

α) Gelungene Fälle.

In gelungenen Fällen ist das Gefäß mit dem um die Nahtstelle liegenden Gewebe verklebt, weshalb die Gefäßwand beim Durchschneiden verdickt

---

[1]) *A. Carrel,* Latent Life of Arteries. The Journ. of exper. Med. 1910. Vol. **12.** p. 460.

zu sein scheint; das Lumen ist durch die Verdickung der Gefäßwand nicht verengt. An der Innenwand wird die Nahtstelle durch eine gerade Linie markiert, an der sich in frischen Fällen leicht vorspringende Seidenfäden erkennen lassen (Fig. 189). Mit der Zeit aber ist immer schwerer die Nahtlinie aufzufinden (Fig. 190: ein querer Schnitt. Fig. 191: ein schräger und Fig. 192 ein Festonschnitt).

b) Mißlungene Fälle.

Hat während der Operation Schädigung der Intima oder Verengerung des Lumens oder zu starke Blutung stattgefunden, so führt es zu Mißerfolgen. Es entsteht entweder Thrombosebildung oder Blutung.

Hat sich an der Nahtstelle ein Thrombus gebildet, so nimmt der weitere Verlauf zweierlei Richtungen an: entweder folgt nach einiger Zeit eine bindegewebige Degeneration des Gerinsels oder aber gehen die vereinigten Gefäßenden auseinander und es entsteht eine Blutung, welch

Fig. 189.



Fig. 190.



Fig. 191.



Fig. 192.



letztere unter Umständen zum Tode des Tieres führen kann. Nicht selten bildet sich an der Nahtstelle Erweiterung des Gefäßlumens (Aneurysma) ohne jede gefährliche Komplikationen. Das letztere findet hauptsächlich bei Venen statt.

b) Mikroskopische Befunde.

Das gründlichste Studium der mikroskopischen Erscheinungen bei der Gefäßnaht verdanken wir hauptsächlich *Enderlen* und *Borst*[1]) und *A. J. Morozowa.*[2])

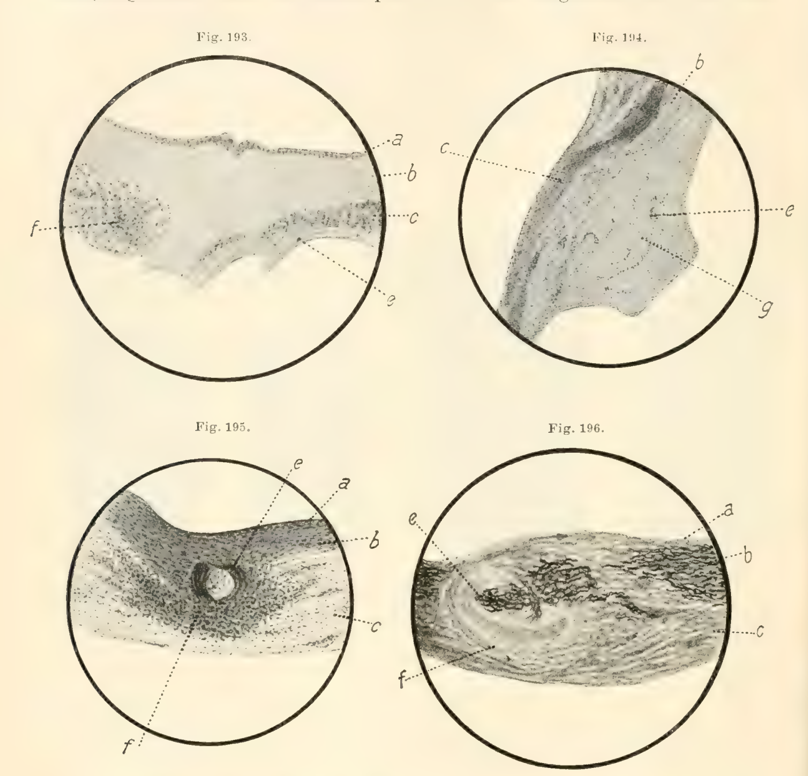
Kurz nach der Operation werden der Wundspalt und die Fädenmaschen von der Lumenseite mit Blutplättchen bedeckt und es bildet sich ein Fibrinthrombus, der die primäre Verklebung der Wunde besorgt.

---

[1]) *Enderlen* und *Borst,* Beiträge zur Gefäßchirurgie und zur Organtransplantation. Münch. med. Wochenschr. 1910. S. 1865.

[2]) *A. Morozowa,* Zur Lehre von der Gefäßnaht. Dissertation (russisch). 1909.

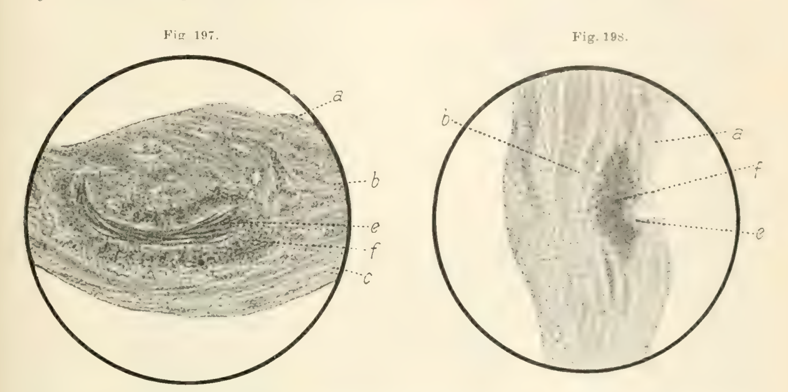
Allmählich entwickelt sich von den vereinigten Gefäßstümpfen aus eine zellige Intimawucherung, die den Thrombus überzieht und substituiert (Fig. 193: A. carotis eines Hundes durchgeschnitten und vereinigt). In der Adventitia und in dem periadventitiellen Gewebe findet man in der Fädenumgebung, wie das auch in allen anderen Organen der Fall ist, Wanderzelleninvasion mit Granulationsgewebe und Riesenzellen (Fig. 194: Vereinigungsstelle eines Carotisstumpfes mit einem eingeschalteten Stück aus



der V. jugularis ext. desselben Hundes; Fig. 195: V. jugularis ext. eines Hundes durchgeschnitten und vereinigt; Fig. 197: ein Stück A. femoralis vom Menschen in A. carotis eines Hundes eingeschaltet; Fig. 198: ein Stück A. carotis eines Hundes autoplastisch eingeschaltet). In der Media finden nebeneinander zweierlei Prozesse statt: Muskelzellenwucherung und Bindegewebsproliferation; es kommt aber nie zu einer völligen Wiederherstellung der Muskularis (Fig. 193). Es bildet sich auf Kosten der Intima und Adven-

titia eine fibröse mit elastischen Fasern versehene Narbe (Fig. 196). In der Intima lassen sich an der Narbestelle neugebildete glatte Muskelfasern aufdecken, die aber nach *Borst* als Derivate der gewucherten Endothelzellen anzusehen sind, die sich sowohl nach der Seite der Fibroblasten als der Elasto- und Myoblasten differenzieren. In den Abbildungen 193—198 bedeutet *a* die Intima, *b* die Media, *c* die Adventitia, *e* Fädenstiche, *f* Zellinfiltration, *g* Granulationsgewebe mit Riesenzellen.

Fig. 197. Fig. 198.

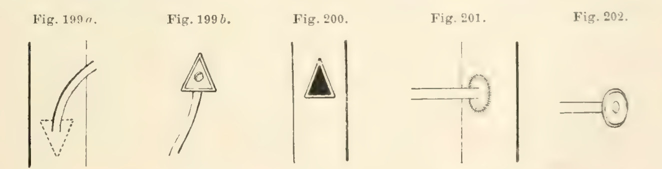


In mißlungenen Fällen findet man Blutungen, Blutreste, leukozytäre Infiltration oder Bindegewebe in verschiedenen Wucherungsstadien. Die mikroskopischen Bilder variieren hier selbstverständlich je nach den Umständen.

2. Die Seiten- resp. Lappennaht.

Bei der Seitennaht wird in Hauptzügen dieselbe Technik angewandt wie bei der zirkulären Naht. Es differiert nur die Zahl der Haltfäden. Das zu trans-

Fig. 199 *a*. Fig. 199 *b*. Fig. 200. Fig. 201. Fig. 202.

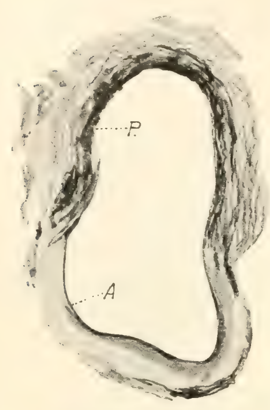


plantierende Gefäß wird mit einem Dreiecklappen[1]) (Fig. 199 *a* und 199 *b*) vom Austritts- resp. Zutrittsstamm ausgeschnitten und zum betreffenden Gefäß, wo ein passendes Dreieck ausgeschnitten worden ist (selbstverständlich unter Abklemmen des Gefäßes), und wie oben beschrieben zugenäht.

[1]) *A. Carrel* et *C. C. Guthrie*, Resultats du patching des artères. Compt. rendus des séances de la Soc. de Biologie. 1909. T. **60**. p. 1009.

Der Defekt im Gefäß (Fig. 200), welcher nach dem Ausschneiden des Lappens entstanden ist, wird durch ein entsprechendes Stück (Fig. 201—202) ersetzt, welches entweder einer Arterie oder Vene oder sogar dem Peritoneum[1]) (Fig. 203) entnommen ist. Man kann dazu auch ein Stück Gummi[2]) benutzen.

Fig. 203.



A Arterialwand, *P* Peritoneumstück.

D. Anwendung der Gefäßnaht.

Die Gefäßnaht, welche in der chirurgischen Praxis als solche bei Gefäßverletzungen, bei Gefäßkrankheiten, bei beginnenden Gangränen schon ein breites Anwendungsgebiet sich geschafft hat, wird zweifellos bald auch vielseitige Anwendung bei biochemischen Studien finden. Hauptsächlich wird es sich handeln 1. um Ableitung des Blutstromes von einem Organ zum anderen zwecks Einblickes in die Organfunktionen und 2. um Organtransplantationen. Auch für die Klärung einiger dunkler Fragen auf dem Gebiete der inneren Sekretion wird man hoffentlich oft Gebrauch von der Gefäßnaht machen. Es hat kaum Zweck, auf die Einzelfragen in den angedeuteten Gebieten hier einzugehen. Es genügen als Beispiel Experimente, die Verf. in Gemeinschaft mit *N. A. Dobrowolskaja*[3]) in Gang gesetzt hat, um einen tieferen Einblick in die Resorptions- und Nierenexkretionserscheinungen zu gewinnen.

Bei normalen Verhältnissen gelangen die aus dem Darm resorbierten Abbauprodukte von Eiweiß und Kohlenhydraten zuerst durch die Pfortader in die Leber, dann kommen sie in den allgemeinen Kreislauf und teilweise in die Nieren, wo Exkretion nach außen geschieht. Auf diesem Wege erleiden mehrere Resorptionsprodukte verschiedene chemische Änderungen, die noch nicht geklärt sind. Um diese komplizierten Verhältnisse gewissermaßen auseinanderzulegen, wurde versucht, das Pfortaderblut direkt in bestimmte Organe abzuleiten. Vor allem wurde dieses Blut in eine Nierenarterie gerichtet und dann die Einwirkung dieser experimentellen Anomalie auf die Zusammensetzung des Harns untersucht. Es wurde zu diesem Zweck eine Anastomose zwischen dem zentralen Ende der V. lienalis und dem peripheren Ende der A. renalis ausgeführt. Die Versuche sind noch im Gange.

Im allgemeinen lassen sich zwei Anastomosearten unterscheiden: 1. eine einartige, indem entweder zwei Arterialstümpfe oder zwei Venen-

[1]) *A. Carrel* et *C. C. Guthrie,* Resultats du patching des artères. Compt. rendus des séances de la Soc. de Biologie. T. **60**. p. 1009.

[2]) *A. Carrel,* Patching of the abdominal aorta with a piece of rubber. The journ. of exp. Med. 1911. p. 126.

[3]) *E. S. London* und *N. A. Dobrowolskaja,* die Arbeit erscheint demnächst.

stümpfe vereinigt werden, und 2. eine verschiedenartige, indem ein Arterialstumpf mit einem Venenstumpf anastomosiert wird. In letzterem Fall lassen sich wieder mehrere Variationen unterscheiden. Es werden vereinigt: der zentrale Stumpf einer Vene mit dem *a)* zentralen oder *b)* peripheren Stumpf einer Arterie. Im Falle, wo der zentrale Stumpf einer Arterie mit dem peripheren Venenstumpf vereinigt wird, werden nach Verlauf von 4—5 Stunden die Klappen umgekehrt und der Blutstrom bricht ein.

Es kann auch vorkommen, ein Venenstück in eine durchschnittene Arterie einzupflanzen; das gelingt sehr gut. Das implantierte Gefäßstück gibt dabei dem hohen arteriellen Blutdruck nach und wird aufgetrieben (Fig. 204). Mit der Zeit aber paßt sich die Venenwand an, indem selbe

Fig. 204.



Fig. 205.



Fig. 206.



Fig. 207.



an Dicke zunimmt (Fig. 205: drei Tage nach der Operation; Fig. 206: zwei Wochen und Fig. 207: drei Monate nach der Operation).

Carrel [1]) hat die Gefäßnahttechnik angewandt zur Vereinfachung der *Eck*schen Operation. Er verfährt folgenderweise: Nach Eröffnung der Bauchhöhle werden die Därme auf die linke Seite gelegt, die V. portae und cava bloßgelegt und an ihnen die zu vereinigenden Stellen angemerkt. Ober- und unterhalb werden die Venen vermittelst Mullbänder unterbunden. Es werden parallele Schnitte gemacht; das Blut ausgedrückt und durch steriles Vaselin ersetzt. Die Schnittränder werden durch eine einfache

---

[1]) *Alexis Carrel* et *C. C. Guthrie*, Méthode simple pour établir une fistule *d'Eck*. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1906. T. **60**. p. 1104.

fortlaufende Naht zusammengenäht. Endlich kommt die Ligatur an der V. portae.

Denselben Weg hat jüngst *Ernst Jerusalem* [1]) betreten. Es werden nach diesem Autor die mit feinem Gummi überzogenen *Höpfner*schen Klemmen (die Branchen sind höchstens 2 *mm* breit, etwa 7 *cm* lang, sehr elastisch, tadellos schließend und in ihrer ganzen Ausdehnung mit Griffen versehen) in der Weise angelegt, daß der Operateur die Gefäßwand an zwei ca. 6 *cm* voneinander entfernten Punkten mit feinsten Pinzetten faßt, anzieht und der Assistent den auf diese Weise gebildeten Zipfel abklemmt. Es folgt Eröffnung und Bildung der hinteren Fistelwand. Es werden zunächst drei Knopfnähte und dann eine fortlaufende, sehr enge Naht angelegt. Letztere wird mit demselben Faden auf die vorderen Wandlippen fortgeführt und so die Fistelwand geschlossen. Tritt bei Entfernung der Klemmen Blutung ein, so wird die Klemme wieder geschlossen und die betreffende Stelle durch eine Knopfnaht gesichert.

Bis jetzt liegen aber noch keine Beweise vor, daß diese Art von Anastomoseanlegung zu denselben günstigen experimentellen Erfolgen führt wie die typische Verfahrungsart (*E. S. London* [2]).

II. Transplantationen.

A. Transplantation von Gefäßen.

Je nach der Herkunft des zu verpflanzenden Gefäßes unterscheidet man folgende Transplantationen:

a) autoplastische — vom selben Individuum,

b) homoeoplastische — von derselben Tierart,

c) heteroplastische — von einer fremden Spezies.

a) Mit unfehlbarer Sicherheit gelingt die Autotransplantation. Das implantierte Gefäßstück heilt intakt ein.

b) Bei den homoeoplastischen Transplantationen von Gefäßen, wie die eingehenden Untersuchungen von *Enderlen* und *Borst* [3]) zeigen, geht die Wundheilung nur vom körpereigenen Gewebe aus und das körperfremde Gefäßstück verfällt einer langsamen Resorption und Substitution durch körpereigenes Gewebe. Von dem körpereigenen Gefäß her schiebt sich eine Intimawucherung über das eingepflanzte körperfremde Arterienstück, wodurch dieses letztere zunächst völlig durch körpereigenes Gewebe gegen den Blutstrom hin abgeschlossen wird.

c) Bei heteroplastischen Transplantationen haben einige Autoren [*Stich*, *Carrel* und auch *A. J. Morozowa* (Fig. 208)] gute, aber wahrscheinlich nur temporäre Erfolge gehabt; meistenteils tritt Thrombose, wie in einem

[1]) *Ernst Jerusalem*, Eine Vereinfachung in der Operationstechnik der *Eck*schen Fistel. Zentralbl. f. Physiol. 1910. Bd. **24**. S. 837.

[2]) *E. S. London*, *Abderhaldens* Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. **3**, S. 114.

[3]) *Enderlen* und *Borst*, Beiträge zur Gefäßchirurgie und zur Organtransplantation. Münch. med. Wochenschr. 1910. 1865.

Falle von *A. J. Morozowa* (Fig. 209), Obliteration und Resorption des eingepflanzten Stückes ein.

Die Erfahrung zeigt, daß es nicht unbedingt notwendig ist, frisch ausgeschnittene Gefäßstücke zu überpflanzen. So gelang es z. B. *Carrel*[1]), mit gutem Erfolg ein Stück Abdominalaorta zu überpflanzen, welches 20 Tage lang im Eisschrank in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt wurde. In einem Falle erhielten *Carrel* und *Guthrie* gute mikroskopische Resultate sogar nach 35tägiger Konservierung bei einer Beobachtungsdauer bis zu $1^1/_2$ Jahren. Mikroskopisch ließen sich hochgradige Veränderungen der Gefäßwand nachweisen.

Fig. 208.



A. femoralis vom Menschen in A. carotis eines Hundes eingeschaltet.

Fig. 209.



A. poplitea vom Menschen in A. carotis eines Hundes eingeschaltet.

Nach *Guthrie* ist weder die Vitalität noch die chemische Intaktheit des Gefäßes Vorbedingung für das Ausbleiben von Thrombose: er konservierte ein Stück der V. cava eines Hundes 60 Tage lang in $2^1/_2$ % Formalin. Nach Waschen mit dünner Ammoniaklösung, Entwässerung in Alk. abs., Auswaschen in *Locke*scher Lösung und Imbibierung mit Paraffinöl wurde das so behandelte Venenstück in die Karotis eines anderen Hundes eingenäht. Nach 22 Tagen erwies sich die Einheilung als ausgezeichnet. Weitere Versuche in dieser Richtung sind wünschenswert.

B. Massentransplantationen von Organen.

Unter Massentransplantation eines Organs versteht man die Überpflanzung des Organs mit seinem zu- und abführenden Blutgefäß. Für biologisch-chemische Studien kann die Massentransplantation jedes Organs zwecks eingehenderen Studiums seiner Funktions- resp. Sekretions- oder Exkretionsverhältnisse Platz finden. Die Technik der Massentransplantation ist in ihren Hauptzügen bei allen Organen dieselbe. Es variieren nur die Einzelheiten je nach örtlichen Bedingungen. Aus diesem Grunde scheint es genügend zu sein, ausführlich nur eine Organtransplantation beispielsweise darzustellen, und zwar die Nierentransplantation, weil sie am schwierigsten erscheint.

---

[1]) *Alexis Carrel,* Resection de l'aorte abdominale et hétérotransplantation. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1907. T. 62. p. 13.

1. Nierentransplantation.

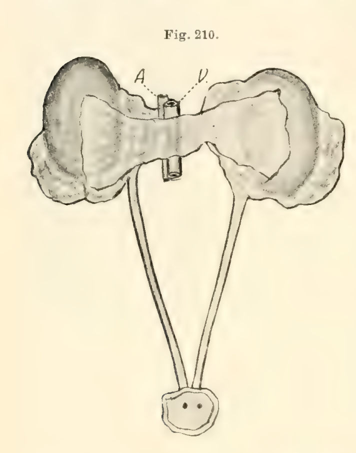
Historisches. Die autoplastische Transplantation wurde zuerst von *Ullmann*[1]) und dann in demselben Jahre von *A. Carrel*[2]) vorgenommen. Weitere Mitteilungen hierüber liegen seitens *C. Beck*[3]), *Floresco*[4]), *Stich*[5]) und *Zaayer*[6]) vor. Es ist auch versucht worden, Nieren von einem Affen auf Menschen zu übertragen.[3])

Die Operation besteht aus einigen verschiedenen Momenten.

a) Nierenexstirpation.

1. Die Bauchhöhle wird durch einen genügend langen transversalen Schnitt geöffnet. Die Därme werden vom Operationsfeld weggeschoben oder, falls nötig, eventeriert und mit einem eingefetteten Seidenumschlag und einer wollenen Decke bedeckt.

Fig. 210.



α) Exstirpation einer Niere.

Das Bauchfell wird, vom mittleren Teile der Nierengefäße beginnend, kreisrund um die zu exstirpierende Niere herum durchgeschnitten. Die beiden Bauchfellblätter werden einerseits bis zur V. cava und andrerseits bis zum Hilus der Niere abpräpariert. Man löst die Gefäße von der Unterlage los, trennt die V. spermatica zwischen Ligaturen durch, löst die Rückseite der Niere los, indem man letztere von dem umgebenden Zellgewebe unter Unterbindung der blutenden Gefäße abpräpariert. Es folgt die Präparation der A. und V. renalis bis zur Aorta resp. V. cava, wo selbe — zuerst die Arterie und nachher die Vene — unterbunden, ein wenig weiter mit glattflächigen Klammern abgeklemmt und endlich durchgeschnitten werden.

Der Harnleiter wird einige Zentimeter vom Nierenhilus abgeschnitten.

---

[1]) *Ullmann*, Wiener klin. Wochenschr. 1902. Bd. **15**. S. 281 u. 707.

[2]) *A. Carrel* et *C. C. Guthrie*, Transplantation des deux reins d'un chien sur une chienne sont les deux reins sont exstirpés. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1906, T. **60**. p. 465.

[3]) Vgl. *A. Carrel*, Doppelte Nephrektomie und Reimplantation einer Niere. Arch. f. klin. Chir. 1909. Bd. 88. S. 379.

[4]) *N. Floresco*, Transplantation des Organes; Conditions anatomiques et techniques de la transplantation du rein. Journ. de physiol. et pathol. générale. 1905. T. 7. p. 47.

[5]) *Stich*, 1. Archiv. f. klin. Med. 1907. Bd. 83. S. 404; 2. Über Gefäß- und Organtransplantationen mittelst Gefäßnaht. Ergebn. d. Chir. und Orthopädie. 1910. Bd. 1.

[6]) *Zaayer*, Nierentransplantation. Tijdschrift voor Geneeskunde. 1908. (Ref. Deutsche med. Wochenschr. 1908. Nr. 41.)

β) **Exstirpation beider Nieren.**

Die Laparotomie wird von Lende zu Lende geführt. Beide Nieren nach der oben angegebenen Art herauspräpariert, die Aorta *(A)* oberhalb und unterhalb der Ausgangsstelle der Nierenarterien und die V. cava *(V)* oberhalb und unterhalb der Einmündungsstelle der Nierenvenen abgeklemmt und durchgeschnitten (Fig. 210). Man schneidet die Einmündungsstelle der Harnleiter aus der Blase aus und vernäht die darin entstandene Wunde.

b) Vorbereitung der zu transplantierenden Niere.

Die Gefäßenden der exstirpierten Niere werden frei präpariert und das Gefäßsystem durch Ausspülung mit *Locke*scher Lösung vom Blut völlig befreit.

Die Zusammensetzung dieser Flüssigkeit ist folgende:

Natriumchlorid	9·0
Kalziumchlorid	0·24
Kaliumchlorid	0·42
Natriumbikarbonat	0·2
Traubenzucker	1·0
Wasser	1000·0

Die *Locke*sche Lösung wird so lange in die Arterie gespritzt, bis aus der Vene ganz farblose Flüssigkeit zurückkommt. Das Nierenpräparat wird dann in ein Gefäß mit *Locke*scher Lösung gelegt.

c) Vorbereitung der Nierengegend für die Aufpfropfung.

Die vorliegenden Gefäßenden werden mit Vaselin bestrichen und mit den entsprechenden Enden des Versuchstieres (Fig. 211 und 212) vereinigt. Man näht erst die Arterien und nachher die Venen. Dagegen werden die Klemmen erst von der Vene und nachher von der Arterie entfernt. Gewöhnlich wird der Blutstrom sofort hergestellt, die Niere bekommt ihre normale Farbe wieder und die Gefäße der Harnleiter beginnen zu bluten: die Harnleiterenden werden vereinigt. Die Niere wird in ihre normale Lage gebracht und das Peritoneum resp. das retroperitoneale Gewebe vernäht. Endlich vereinigt man den peritonealen Nierenüberzug mit dem Bauchfell durch 5—6 Situationsnähte.

d) Extraperitoneale Nephrektomie.

Diese Operation wird dann vorgenommen, wenn man eine Niere entfernen will, ohne die Bauchhöhle zu öffnen.

Das Tier wird auf der Seite am Tische gebunden. Es wird ein schräger Hautschnitt gemacht von der Spitze der 11. oder 12. Rippe beginnend bis zum Rande des M. recti. Die Richtung und die Länge des Schnittes variiert je nach der Gattung des Tieres. Nach Durchschneidung der Muskelschicht wird mittelst 2 Finger die Niere aufgesucht, entriert und nach oben herausgezogen. Mittelst einer Kropfsonde werden die Ge-

bilde des Hilus sorgfältig isoliert. Der Ureter, welcher nach unten liegt, wird zuletzt ligiert und zuerst Arteria und Vena renalis. Es folgt Abschneiden der Hilusgebilde und Vernähen der Wunde.

e) Folgen der Nierentransplantation.

1. Nach *Carrels*[1]) Beobachtungen muß anerkannt werden, daß eine Niere, welche exstirpiert, gewaschen und nachher wieder eingesetzt wurde, imstande ist, in normaler Weise zu funktionieren, und zwar während einer langen Zeit nach der Operation.

Fig. 211.

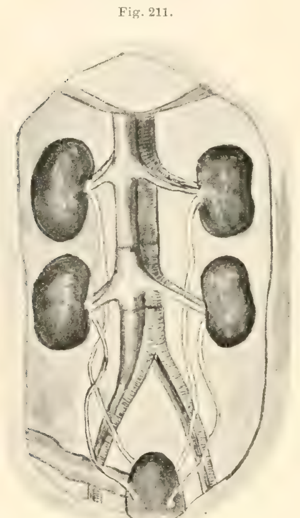
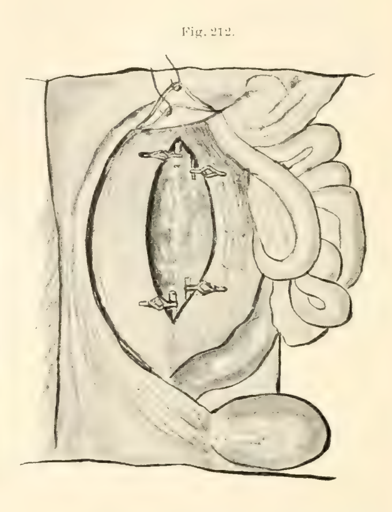


Fig. 212.



2. Wie die Gefäßtransplantationen sind auch die Operationsergebnisse verschieden, je nach der Tierart.

Es lassen sich auch hier auto-, homoeo- und heteroplastische Überpflanzungen unterscheiden.

α) Autoplastik. Eine exstirpierte und nachher wieder eingesetzte Niere ist imstande so zu funktionieren, daß das Tier mehr wie 8 Monate nach der Operation bei vorzüglichster Verfassung bleibt *(Carrel).*

β) Homoeoplastik. Versuche über homoeoplastische Gruppentransplantationen der beiden Nieren haben gezeigt, daß die Organe während mehrerer Wochen ihre Funktion auslösen können; es ist jedoch nicht erwiesen, ob die Tätigkeit sich für eine noch längere Zeit aufrecht erhalten läßt.

[1]) Vergl. *A. Carrel,* Doppelte Nephrektomie und Reinplantation einer Niere. Arch. f. klin. Chir. 1909. Bd. 88. S. 379.

Das Überstehen der operativen Eingriffe, der temporären Zirkulationsunterbrechung, der Durchspülung und der Durchtrennung der Nieren durch die ausgezeichnete Funktion des Organs wurde mehr als 8 Monate nach der Operation erwiesen.

γ) Heteroplastische Nierentransplantation wurde zuerst von *Jaboulay*[1]) im Jahre 1906 ausgeführt, indem er 2 Frauen mit unheilbarer Nephritis Schweinenieren in die Fossa axillaris einnähte. Die A. renalis wurde mit der A. brachialis und die V. renalis mit der V. humoralis vereinigt. Die Erfolge dieser Operation waren keine günstigen, weil die vereinigten Gefäße obliteriert wurden.

Ebenso ungünstig fielen die weiteren Versuche dieser Art am Menschen aus.

Die Möglichkeit einer günstigen Heterotransplantation einer Niere ist überhaupt noch gar nicht erwiesen.

2. Die Sekretionstätigkeit einer transplantierten Niere ist in genügender Weise noch nicht studiert worden. Aus den Untersuchungen von *Carrel* und *Guthrie*[2]) ist nur so viel zu ersehen, daß eine transplantierte Niere 4—5mal mehr Urin abgibt als die normale und daß man in diesem Urin geringe Mengen Eiweiß, Sulfate, Chloride, aber weder Zucker noch Pigmente auffinden kann.

Selbstredend können und müssen weitere Versuche mit Nierentransplantation viele unklare Fragen der Harnsekretion aufhellen.

2. Transplantation der übrigen Organe.

Außer den Nieren wurden Massentransplantationen noch vieler anderer Organe ausgeführt (Schilddrüse[3]) [Fig. 213], Milz[4]), Ovarien[5]), Darmstück, Herzen mit und ohne Lungen, Gliedmaßen[6]), Kopf). Daß die anatomische Einheilung der transplantierten Schilddrüsen mit deren normalen physiologischen Funktionstüchtigkeit gleichbedeutend ist, hat *Stich* durch Hervorrufung typischer Tetaniesymptome nach der Exstirpation der überpflanzten Drüse (245 Tage post impl.) schlagend bewiesen. Im Prinzip bleibt die Überpflanzungstechnik dieselbe wie bei den Nieren. Nur folgendes muß hervorgehoben werden: Die Nierenarterien sind bei den meisten Tieren

---

[1]) *Jaboulay*, Chirurgie des artères. La semaine médicale. 1902. p. 405.

[2]) *Alexis Carell* et *C. C. Guthrie*, Circulation et sécrétion d'un rein transplanté. Compt. rend. des séances de l'Acad. des sciences. 1905.

[3]) *a) Alexis Carrel* et *C. C. Guthrie*, Exstirpation et replantation de la glande thyroïde avec reversion de la circulation. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1905. T. **59**. p. 413. — *b) Stich* und *Makkas*, Zur Transplantation der Schilddrüse mittelst Gefäßnaht. *Bruns'* Beiträge. 1908.

[4]) *N. Lüdke*, Über Milchtransplantationen. Münchener med. Wochenschr. 1909. Nr. 29 u. 30.

[5]) *Alexis Carrel* et *C. C. Guthrie*, Technique de la transplantation homoplastique de l'ovaire. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1906. T. **60**. p. 466.

[6]) *Alexis Carrel*, Transplantation de la cuisse d'un chien sur un autre chien. Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1907. LXII. p. 1035.

genügend groß, so daß die direkte Gefäßanastomose gelingt. Bei den anderen Organen ist es aber selten der Fall, weshalb man lieber die Lappenmethode anwendet.

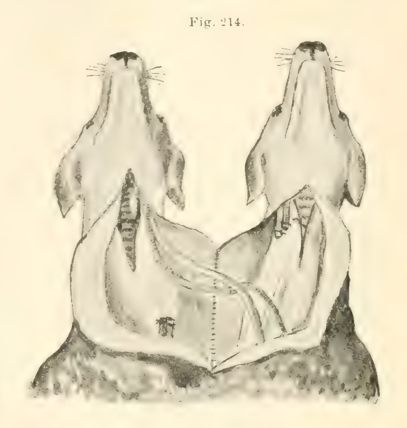
Anwendungsgebiet. 1. Wie eingangs erwähnt, haben die hier dargelegten Operationen ihre Anwendbarkeit im Gebiete der experimentellen physiologisch-chemischen Studien noch nicht in genügendem Maße bewährt. Es kann also bei der Behandlung dieser Frage nur von Ausblicken

Fig. 213.



C. A. Carotis. *Th.* A. Thyreoidea.
V. V. Thyreoidea.

Fig. 214.



die Rede sein. Von diesem Gesichtspunkte aus scheint es vor allem nützlich zu sein, auf folgendes hinzuweisen.

Die gegenwärtig so eifrig studierte Frage über die innere Sekretion der Organe wird viel reichlichere Resultate liefern, sobald es möglich geworden ist, beim im übrigen ganz normalen Tier die Untersuchung respektive Gewinnung des Blutes von verschiedenen sonst tief liegenden Organen zugängig zu machen. Mit der Ausarbeitung der Technik der Massentransplantationen kann jedes tief liegende Organ durch die Überpflanzung an eine solche Stelle, wo zugängliche oberflächlich liegende Gefäße (z. B. V. jugularis ext.), aus denen das Blut mittelst einer Spritze entnommen wird, gebracht werden.

2. Es ist weiter doch merkwürdig, daß ein Organ, welches durch spezifische Nerven in seiner Funktionstätigkeit normaliter geleitet wird, auch ohne diesen normalen Nerveneinfluß gewissermaßen funktionieren kann. Inwiefern also für jedes einzelne Organ der Reiz spezifischer Nerven, was dessen

äußere und innere Sekretion anbelangt, maßgebend ist — diesbezügliche Fragen können durch Massentransplantationsversuche Klärung gewinnen.

3. Es ist *Carrel*[1]) gelungen, ein ganzes Glied (Femur) von einem Hunde an einen anderen zu überpflanzen. Es wurden zuerst die Knochen, dann deren Periosteum, die Muskeln (Quadriceps und Adductores) zusammengenäht, die Gefäße anastomosiert, die Nerven (Ischiadicus und Cruralis) und endlich die Aponeurosen und die Haut vereinigt. Auch solche Hunde werden sich zweifellos zur Klärung einiger biochemischen Fragen als geeignet erweisen. Als Beispiel soll hier der Versuch angeführt werden, den *Enderlen* und *Borst*[2]) an Hunden ausgeführt haben. Sie stellten namentlich bei Hunden einen direkten Blutaustausch her, indem sie die Karotiden und Vv. jugulares der beiden Tiere vereinigten (Fig. 214). Mittelst Indigokarmin und Phloridzin wurde festgestellt, daß ein vollständiger Blutaustausch zwischen beiden Hunden erzielt wurde. Länger als drei Tage konnten die Autoren aber die Parabiose nicht aufrecht erhalten. Die Autoren schließen daraus, daß die biochemischen Verschiedenheiten der Zellen zweier Individuen zu groß und daß eine Homoeo-Überpflanzung oder Zupflanzung dauernde Erfolge darbiete, selbst wenn Blutzufuhr genügend ist und die bekannten *Roux*schen Postulate erfüllt sind.

Mit einem Worte, die Verpflanzungsmethoden sind gegeben und es bleibt übrig, selbe für Klärung biochemischer Probleme möglichst breit auszunutzen.

---

[1]) *Alexis Carrel,* Transplantation de la cuisse d'un chien sur un autre chien Compt. rend. des séances de la Soc. de Biol. 1907. LXII. p. 1035.

[2]) *Enderlen* und *Borst,* Beiträge zur Gefäßchirurgie und zur Organotransplantation. Münchener med. Wochenschr. 1910. S. 1865.

Die Technik der Gewebskultur in vitro.

Von **Alexis Carrel** und **Montrose T. Burrows**, New York.

(Aus dem Laboratorium des Rockefeller Institutes für medizinische Forschung.)

Man kultiviert ein Gewebe oder ein Organ, indem man unter gewissen Bedingungen Fragmente dieses Gewebes oder Organes in einen passenden Kulturnährboden einimpft. Diese neue Methode, deren Resultate zum Teil schon beschrieben worden sind [1]), ist zahlreicher Anwendung fähig.

---

[1]) *Harrison,* Observations on living developing nerve fibres. Proc. of the Soc. for Exp. Biolog. and Med. 1907. p. 140. — Embryonic transplantation and the development of the nervous system, the Harvey lectures 1907—1908. — The outgrowth of the nerve fibre as a mode of protoplasmic movement. Journal Exp. Zool. 1910. Vol. **9**. p. 787. — *Burrows,* The growth of tissues of the chick embryo outside of the animal body with special reference to the nervous system. Journal of Exp. Zool. 1911. Vol. **10**. p. 63. — Culture des tissus d'embryon de poulet et spécialement culture des nerfs de poulet en dehors de l'organisme. C. R. Soc. de Biologie. 1910. p. 291. — *Carrel* and *Burrows,* Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. Journ. Am. Med. Assoc. 1910. p. 1379. — Cultivation of sarcoma outside of the body. Journ. Am. Med. Assoc. 1910. p. 1554. — Human sarcoma cultivated outside of the body. Journ. Am. Med. Assoc. 1910. p. 1732. — Artificial stimulation and inhibition of the growth of normal and sarcomatous tissues. Journ. Am. Med. Assoc. 1911. p. 32. — Cultivation of tissues in vitro and its technique. Journal of Exp. Med. 1911. Vol. **13**. p. 387. — Cultivation in vitro of the thyroid gland. Journ. of Exp. Med. 1911. Vol. **13**. p. 416. — On the physico-chemical regulation of the growth of tissues. Journ. of Exp. Med. 1911. Vol. **13**. p. 562. — Cultivation in vitro of malignant tumors. Journ. of Exp. Med. 1911. Vol. **13**. n. 571. — La culture des tissus adultes en dehors de l'organisme. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 293. — Culture de substance rénale en dehors de l'organisme. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 298. — Culture de moelle osseuse et de rate. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 299. — Cultures primaires, secondaires et tertiaires de glande thyroïde et culture de péritoine. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 329. — Culture de sarcome en dehors de l'organisme. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 332. — Culture in vitro d'un sarcome humain. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 367. — Seconde génération de cellules thyroïdiennes. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 365. — A propos des cultures „in vitro" des tissus de mammifères. C. R. Soc. de Biol. 1911. p. 3. — La culture des tissus in vitro. La Presse Médicale. 1911. p. 209. — *Carrel,* Abnormal forms of life and their applications. American Philosophical Society, Philadelphia 1911. — *Ruth,* Cicatrisation of wounds in vitro. Journ. of Exp. Med. 1911. Vol. **13**. p. 422. — The influence of distilled water on the healing of skin wounds in the frog. Journ. of Exp. Med. 1911. Vol. **13**. p. 559. — Cicatrisation de plaies cutanées en dehors de l'organisme. C. R. Soc. de Biol. 1911. pag. 253. — *Jolly,* A propos des communications de *MM. Alexis Carrel* et *Montrose T. Burrows* sur la culture des tissus. C. R. Soc. de Biol. 1910. p. 470. — Observations à l'occasion de la communication de *MM. Carrel* et *Burrows.* C. R. Soc. de Biol. 1911. p. 4. — *Lambert* and *Hanes,* Growth in vitro of the transplantable sarcomas of rats

Hier soll die Technik näher beschrieben werden, mittelst welcher man die Gewebe außerhalb des Organismus erfolgreich kultivieren kann. Die Methode ist in der Theorie sehr einfach, und es ist leicht, ein gewisses Gewebswachstum zu erzielen. Es ist aber nicht so leicht, gleichartig positive Resultate zu erhalten, die untereinander vergleichbar sind. Die Gewebe werden durch Kälte, Trocknen und durch Behandlungen, welche die Bereitung der Kulturen erfordert, leicht getötet. Durch Infektion kann ebenfalls ihr Wachstum verhindert werden. Es ist daher notwendig, daß das Präparieren der Nährböden und der Gewebe aseptisch geschieht, und zwar in einem warmen, feuchten Saal, und daß mit derselben Sorgfalt gearbeitet wird, wie bei einer subtilen chirurgischen Operation.

Alle technischen Einzelheiten müssen vorher sorgfältig studiert werden. Man muß sich davor hüten, der Zusammensetzung des Nährbodens oder der Art der Gewebe, Wachstumsverschiedenheiten zuzuschreiben, die nur auf eine mangelhafte Anwendung der Methode zurückzuführen sind. Wir werden in dieser Abhandlung die Bereitung des Nährbodens, der Gewebe, der Kulturen und die Verfahren zur Beobachtung der Entwicklung der Kulturen beschreiben.

I. Bereitung des Nährbodens.

Man kultiviert die Gewebe im Plasma oder in einem künstlichen Nährboden. Meistens benutzt man Plasma, weil darin das Wachstum der Gewebe reichlicher vor sich geht und längere Zeit andauert als in den künstlichen Nährböden. Diese wendet man dagegen an, wenn es darauf ankommt, die genaue Zusammensetzung des Nährmilieus zu kennen.

Das zu benutzende Plasma kann vom Blute des Tieres entnommen werden, welches das zu untersuchende Gewebe liefert, oder vom Blute eines anderen Tieres derselben Art und schließlich auch von einem Tiere einer anderen Art. Es kann also autogen, homogen oder heterogen sein. Die besten Resultate erhält man bei Kulturen mit autogenem oder homogenem Plasma. Unter Umständen kann man jedoch ganz gut auch heterogenes Plasma benutzen. Die Vegetationen sind allerdings dann weniger üppig. Zum Beispiel kann das Fötusgewebe eines Hühnchens im Plasma vom Menschen oder vom Hunde wohl gedeihen. Froschhaut wächst im Hühnchenplasma nur schwach. Die schönsten Kulturen haben wir immer mittelst des Plasmas erhalten, welches von dem Tiere, dem das zu untersuchende

---

and mice. J. A. M. A. 1911. Vol. **56**. p. 33. — Cultivation in vitro of Rat sarcoma. Inoculation of rats. Subcultures. J. A. M. A. 1911. Vol. **56**. p. 587. — Migration by amoeboid movement of Sarcoma Cells growing in vitro and its bearing on the problem of the spread of malignant growths in the body. J. A. M. A. 1911. Vol. **56**. pag. 791. — Characteristics of growth of sarcoma and carcinoma cultivated in vitro. Journ. of Exp. Med. 1911. p. 495. — A study of cancer immunity by the method of cultivating tissues outside the body. Journ. of Exp. Med. 1911. p. 505. — A comparison of the growth of sarcoma and carcinoma cultivated in vitro. Proc. of Soc. for Exp. Biol. and Med. 1911. Vol. **8**. p. 59.

Gewebe exstirpiert war, herrührte, oder von einem anderen Tier derselben Art.

Das Plasma wird so gewonnen, daß es mehrere Stunden oder mehrere Wochen in dem flüssigen Zustand aufbewahrt werden kann. Das Blut wird einer Arterie oder einer Vene entnommen. Verwendet man hierzu einen Hund, eine Katze, ein Hühnchen, ein Meerschweinchen oder eine Ratte, und soll das Plasma in dem flüssigen Zustand so lange wie möglich aufbewahrt bleiben, so entnimmt man das Blut aus der Halsschlagader oder aus irgend einem anderen großen Blutgefäß unter folgenden Bedingungen: Das Tier wird narkotisiert und das Blutgefäß freigelegt. Die Zirkulation wird dann mittelst einer Klammer unterbrochen. Die Wand wird mit Gaze gerieben und mit Öl bedeckt. Dann wird das Blutgefäß geöffnet, und eine mittelst Olivenöls sterilisierte Glaskanüle in das Lumen eingeführt, ohne daß die Spitze dabei das Gewebe berührt. Hierauf wird das Blut in paraffinierten Glaszylindern gesammelt, die vorher auf 0° abgekühlt wurden. Bei Blutentnahme vom Menschen kann man sich einer einfacheren Methode bedienen. Eine mittelst Öls sterilisierte Nadel wird durch die Haut in eine Vene eingeführt, worauf das Blut mit einer Spritze, die auch mit Öl behandelt war, entzogen und sofort in die paraffinierten Zylinder gebracht wird.

Die Zylinder werden mit Kork zugestopft, in größere Zylinder, die mit schmelzendem Eis gefüllt sind, gestellt und 5 Minuten lang zentrifugiert; dann läßt man sie in einem kleinen Kühlraume bei 0° stehen. Das Plasma wird hierauf in neue Röhren mittelst paraffinierter Pipetten übergeführt. Das Menschen- und Hundeplasma kann, wenn es mit genügender Sorgfalt und bei geeigneter Temperatur gesammelt wird, oft mehrere Tage lang aufbewahrt werden. Das Rattenplasma koaguliert dagegen rasch. Das Hühnchenplasma kann lange Zeit flüssig bleiben. Wir haben vortreffliche Kulturen in Hühnchenplasma gemacht, das sogar zwei Monate lang im Eisschrank aufbewahrt worden war. Jedenfalls ist es im allgemeinen unnütz, kompliziertere Methoden für die Vorbereitung des Plasmas zu gebrauchen. Immerhin kann es zuweilen sehr vorteilhaft sein, das Plasma in anderer Art aufzubewahren. *Burrow* gebrauchte oxaliertes Plasma. Man fügt dem Blute bei dieser Methode $^{1}/_{1000}$ Natriumoxalat hinzu. Wenn die Kultur präpariert wird, so fällt man unmittelbar vorher das Natriumoxalat mittelst Calciumchlorids. Obgleich das oxalierte Plasma nicht so gute Resultate wie das reine Plasma ergibt, kann man es nötigenfalls doch gut benutzen.

Wir haben auch Plasma verwendet, das durch Zusatz von destilliertem Wasser oder verschiedener Salzlösungen, oder auch von Gewebs-, Organ- oder Geschwulstextrakten modifiziert worden war. Derartig vorbereitetes Plasma übt manchmal für das Gewebewachstum einen günstigeren Einfluß aus als normales Plasma.

Mit künstlichen Nährböden wurden bis jetzt nicht so günstige Resultate erzielt, wie mit Plasma. Derartige Nährböden sind bei der Temperatur

von 37° bis 39° C entweder flüssig oder fest. *Lewis*[1]) benutzte einen Kulturnährboden, der aus einer Lösung nach *Locke* aus Agar-Agar und Bouillon bestand. Wir verwenden meistens Nährböden analoger Zusammensetzung, bei welcher ein Wachstum der embryonalen Gewebe vor sich geht. Die Zusammensetzung ist folgende:

Natriumchlorid	0·9
Calciumchlorid	0·024
Kaliumchlorid	0·042
Glukose.	0·1
Agar.	3
Destilliertes Wasser	100

Zuweilen fügen wir dieser Mischung noch 0·02 Natriumkarbonat oder Natriumphosphat hinzu.

Die Zusammensetzung der Nährböden kann in mannigfaltiger Weise modifiziert werden, indem man die verschiedenen Salzmengen ändert. In einem Nährboden, der nur aus Calciumchlorid, Natriumchlorid und Agar-Agar besteht, entwickeln sich gewisse Embryogewebe, wenigstens während einer kurzen Periode, sehr gut.

Für die am meisten angewandten flüssigen Nährböden kommen folgende Lösungen in Betracht: die Lösung nach *Locke*, oder die *Ringer*sche Lösung, eine Lösung von Natriumchlorid in destilliertem Wasser oder Serum, das aus dem Blut oder aus dem Plasma eines Tieres stammt, das entweder derselben Art angehört, wie dasjenige, welches das Gewebe geliefert hat, oder einer anderen Art.

II. Präparieren der Gewebe.

Die Gewebsfragmente, welche als Aussaat dienen, müssen mit sehr großer Sorgfalt vorbereitet werden. Ihr Wachstum wird außerordentlich beeinflußt durch die Art ihrer Abtrennung (Abschneidung), durch die Länge der Periode, die sich seit dem Aufhören des Blutkreislaufes bis zum Beginn der Kultur erstreckt, durch den Grad und die Dauer der Abkühlung usw. Die Gewebe werden dem Tiere während des Lebens oder sofort nach dem Tode exstirpiert. In den Kulturen von menschlichen Geschwülsten bringt man das Gewebe so schnell als möglich nach der Exstirpation in den Kulturnährboden. Jedoch können die Gewebe, ehe sie kultiviert werden, auch einige Zeit lang im Zustand des latenten Lebens erhalten werden. Die Leber und die Hornhaut (Cornea) eines menschlichen Fötus, die 30 Stunden lang im Eisschrank aufbewahrt wurden, ergaben noch ein schwaches Wachstum der Zellen. Wir bewahrten ferner Teilchen der Milz vom Hühnchenembryo 72 Stunden lang im Eisschrank auf und konnten beobachten, daß diese Fragmente, in Plasma eingesät, so reichlich, wie frisches Gewebe, wuchsen. Sicherlich konnte die latente Periode noch leicht verlängert werden.

---

[1]) *Lewis*, The growth of embryonic chick tissues in artificial media, agar and bouillon. Bull. of the Johns Hopkins Hospital. 1911. p. 126.

Ein Milzteilchen, das 6 Tage lang im Eisschrank belassen wurde, konnte ebenfalls in vitro weiter wachsen. Es geht also daraus hervor, daß man sich sowohl des im Eisschrank aufbewahrten Gewebes als auch frischen Gewebes für die Kulturen bedienen kann.

Man legt rasch mittelst einer sehr feinen Nadel und eines *Star*-Operationsmessers ein Fragment des betreffenden Gewebes oder Organes frei und bringt es dann auf ein Deckglas. Diese Ausführung muß sehr schnell geschehen, denn, setzt man die Gewebe längere Zeit der Luft aus, so werden sie getötet. Um das Gewebsteilchen nicht dieser Gefahr auszusetzen, kann man das Präparieren in einem Tropfen *Ringer*scher Lösung vornehmen. Das Gewebsstückchen wird dann in Teilchen zerlegt, die dem Volumen eines Hirschkorns entsprechen, worauf es mittelst der Nadelspitze auf ein Deckgläschen oder ein Uhrglas übergeführt wird. Will man eine ausgedehnte Kultur vornehmen, so bringt man ein Gewebs- oder Organstück auf ein Uhrglas und schneidet es mittelst einer scharfen Schere in sehr kleine Teilchen, die dann auf einer breiten Glasplatte ausgebreitet werden.

III. Herstellung der Kultur.

Die Technik zum Präparieren der Kultur ist eine verschiedene, je nachdem man einen Plasmanährboden oder einen künstlichen benutzt. Die Kulturen, die in einem Plasmanährboden ausgeführt werden, lassen sich in drei Gruppen teilen: Kulturen im Hängetropfen, Kulturen im Uhrglas und die breiten Plattenkulturen.

Bei den Hängetropfkulturen bringt man ein Teilchen des Gewebes auf ein Deckglas und bedeckt es dann augenblicklich mit einem Tropfen Plasma, worauf letzteres mittelst einer Nadel oder einer Messerspitze in dünner Schicht auf dem Deckgläschen ausgestrichen wird. Das Plasma koaguliert rasch und befestigt das Gewebsstückchen am Deckglas. Das Deckgläschen wird nun umgestülpt, auf einen hohlgeschliffenen Objektträger gebracht, dessen Aushöhlung so groß ist, daß der Tropfen den Grund nicht berührt; endlich verschließt man gut mit Paraffin. Diese Operationen müssen sehr rasch vorgenommen werden, damit am Plasmatropfen keine Verdunstung stattfindet. Will man das Wachstum der Gewebe in Plasmen verschiedener Zusammensetzung vergleichen, so muß unter gleichen Bedingungen gearbeitet werden. Die Größe der Höhlung des Objektträgers, die Feuchtigkeitsbedingungen der Luft, die Zeit, die zwischen dem Eintauchen des Gewebes in das Plasma und dem Verschließen der Präparate mit Paraffin vergeht usw., müssen stets gleich sein. Wenn nicht alle Fehlerquellen sorgfältig ferngehalten werden, so sind die Resultate der Gewebskulturen in verschiedenen Nährböden auch nicht genau vergleichbar.

Die Objektträger werden sofort in einen kleinen elektrischen Brutschrank gestellt. Dann werden sie in große, mit Gas geheizte Wärmeschränke gebracht, wo die Hühnchengewebskulturen bei 39°, die Kulturen der Rattengewebe, der Hunde-, Meerschweinchen- und Menschengewebe bei 37° belassen werden.

Bei den Uhrglaskulturen füllt man die Höhlung mit Plasma und bringt dann das Gewebsstückchen in die Mitte der Höhlung. Das Gewebe kann nach allen Richtungen hin wachsen. Man kann Uhrglaskulturen ebenfalls in dünnen Schichten vornehmen. Das Uhrglas wird schließlich umgekippt und auf einem Objektträger befestigt. Bei den großen Plattenkulturen breitet man das in sehr kleine Teilchen zerschnittene Gewebe oder Organ auf einer breiten schwarzen Glasplatte aus, worauf man es gänzlich mit Plasma bedeckt, das in möglichst dünner Schicht ausbreitet wird. Auf diese Weise kann man auf einer einzigen Platte einen 15tägigen Hühnchenembryo, der in feine Stückchen zerhackt wurde, züchten. Der Objektträger wird sofort in eine Glasschale für Kulturen gebracht, denn man muß darauf achten, daß sich keine Luftstäubchen auf der Oberfläche des Präparates absetzen. Das Plasma koaguliert rasch. Man neigt den Objektträger, damit die Sekretionsprodukte der Kultur sich am Grunde der Schale ansammeln können. Dann stellt man unter den Objektträger mit Wasser durchtränkte Watte, damit die Luft feucht gehalten wird. Hierauf wird der Deckel aufgelegt und mit Paraffin befestigt.

Die Bereitung der Kulturen in einem künstlichen, sich verfestigenden Nährboden geschieht ungefähr in der oben beschriebenen Weise. Während des Präparierens des Gewebes wird der Kulturnährboden bei einer Temperatur von 45° gehalten, damit er flüssig bleibt. Mittelst einer Pipette bringt man Tropfen dieser Flüssigkeit auf Deckgläser und legt darauf die Gewebsteilchen. Die Temperatur des Tropfens sinkt rasch und der Nährboden wird gallertartig. Dann wird das Deckglas umgestülpt und an einem Objektträger in der vorher erwähnten Weise befestigt.

Bei der Darstellung der Kulturen in einem flüssigen Nährboden bedient man sich einer sehr geringen Menge Flüssigkeit, die in einer dünnen Schicht auf ein Deckglas aufgetragen wird. Es ist unbedingt nötig, daß die Zellen an dem Deckglas festkleben. Deshalb darf das Gewebsstückchen auch nicht in der Flüssigkeit schwimmen. Man kann diese Kulturen so bereiten, daß man ein sehr kleines Gewebsteilchen zuerst in die *Locke*sche Lösung legt, später sehr sorgfältig mittelst einer Zange herausnimmt und auf ein Deckgläschen bringt. Das Stückchen muß das Deckglas berühren, das den Zellen als Stütze dienen soll. Die durch das Teilchen mitgerissene Flüssigkeit wird in sehr dünner Schicht auf dem Deckglas ausgebreitet, das dann auf einen gewöhnlichen Objektträger, von dessen Wandung es durch eine Vaselinschicht getrennt ist, gelegt wird. Durch den gebildeten sehr kleinen Hohlraum findet keine in Betracht kommende Verdunstung der Flüssigkeit statt. Man kann sich auch eines sehr schwach ausgehöhlten Objektträgers bedienen, der schließlich mittelst Paraffins verschlossen wird.

IV. Aufbewahrung und Untersuchung der Kulturen.

Die Kulturen werden in große, mit Gas geheizte Brutschränke auf Etagen oder in Gruppen von zehn bis zwölf in Glasschalen aufbewahrt. Da durch verschiedene Temperaturgrade die Schnelligkeit des Gewebs-

wachstums beeinflußt wird, so muß man die Temperaturunterschiede im Brutschrank sehr sorgfältig beachten. Man kann dagegen die Kulturen für einige Sekunden aus dem Brutschrank ohne Schaden entfernen. Gewisse Gewebe, wie die der Milz des Hühnchenembryos oder von bösartigen Geschwülsten, verursachen eine solche Zellenwucherung, daß man ihre Entwicklung ohne das Mikroskop deutlich beobachten kann. Das neu erzeugte Gewebe bei einer Milz- oder Geschwulstkultur erscheint in Form einer das ursprüngliche Gewebsteilchen umhüllenden opaleszierenden Zone. Den Anfang des Gewebswachstums kann man häufig durch das Auftreten eines sehr dünnen grauen Streifens auf den glatt geschnittenen Rändern des Stückchens feststellen. Bei den großen Plattenkulturen bemerkt man ab und zu eine weißlich gefärbte Zone, die das wachsende Fragment umgibt. Es ist jedenfalls sehr ratsam, einige Kontrollkulturen im hohlgeschliffenen Objektträger vorzunehmen und das Wachstum unter dem Mikroskop zu beobachten.

Die Kulturen werden mittelst eines Mikroskops untersucht, das in einem kleinen Brutschrank bei 37° oder 39° aufbewahrt wird. Auf diese Weise kann man sie lange beobachten, ohne das Leben der Gewebe zu gefährden. Das Gewebsteilchen stellt sich in Form einer undurchsichtigen (opaken) Masse mit deutlich geschnittenen Rändern dar. Auf dem hellen Grund des Kulturnährbodens bemerkt man unschwer die Zellen, die dort schweben und sich vermehren. Man kann sie sehr leicht mittelst der Camera lucida zeichnen, wenn die Entwicklung langsam vor sich geht, wie z. B. bei den Bauchfell- oder Knorpelkulturen. In den Sarkom- oder Milzkulturen findet aber oft ein so schnelles Wachstum statt, daß genaues Abzeichnen der Zellen unmöglich ist. Wenn der Plasmanährboden dünn ist, und wenn das Gewebe auf einer einzigen Fläche gewachsen ist, kann man die lebenden Zellen leicht photographieren. Meistens geht das Wachstum des Gewebes in mehreren Ebenen vor sich, und es ist dann unmöglich, eine deutliche Photographie davon zu erhalten. Im allgemeinen gewinnt man bessere Aufnahmen, nachdem die Kulturen fixiert und gefärbt worden sind.

Die Kulturen im hängenden Tropfen und im Uhrglas lassen sich sehr einfach fixieren und färben. Das Deckglas, an dem die Kultur anhaftet, wird in eine Lösung von Quecksilberchlorid und Essigsäure oder in irgend eine Kaliumbichromatlösung getaucht. Hierauf wird mit Hämatoxylin gefärbt. Die breiten Plattenkulturen werden mittelst Serienschnitten untersucht. Die kleinen Kulturen dienen zum Studium der Morphologie der Gewebe, während die großen Plattenkulturen zur Untersuchung der dynamischen Änderungen, die in den Zellen während das Lebens außerhalb des Organismus stattfinden, herangezogen werden können. Schließlich können sie auch zum Studium ihrer Sekretionen usw. dienen.

Die beschriebene Technik gestattet Gewebe von embryonalen oder erwachsenen Säugetieren während mehrerer Tage oder selbst einiger Wochen am Leben zu erhalten. Sie wird zweifellos in verschiedener Weise vielfach modifiziert und verbessert werden. Aber schon jetzt kann sie als wertvolles Hilfsmittel für die Erforschung zahlreicher und wichtiger Probleme dienen.

Methoden zur biochemischen Untersuchung des Bodens.

Von **Julius Stoklasa**, Prag.

Der Boden ist den biologischen Veränderungen, welche durch den Einfluß der Organismen des niederen und höheren Pflanzenreiches und Tierreiches hervorgerufen werden, stets unterworfen. Diese biologischen Erscheinungen im Boden sind abhängig:

1. Von den klimatischen Faktoren,
2. von der physikalischen und chemischen Beschaffenheit des Bodens,
3. von der Zusammensetzung der Bodenluft,
4. von der Temperatur des Bodens,
5. von der Zeit und
6. von der Pflanzenvegetation und dem Tierleben.

Im und am Boden befinden sich folgende Pflanzenorganismen und Pflanzenteile:

Myxomyzetes, Schizomyzetes (Bakterien), Mucoraceae, Basidiomyzetes, Askomyzetes, Diatomaceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Lichenes, Hepaticae, Musci, Filizes und Wurzeln aller höheren Pflanzen. Aus dem Tierreich sind Protozoa, Vermes und schließlich die verschiedenen Entwicklungsstadien der Insekten (Larven) vertreten.

Alle diese im Boden vorkommenden Organismen fordern für ihre Vegetation Sauerstoff, Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Chlor, Silizium, Kalium, Natrium, Kalzium, Magnesium, Aluminium, Eisen und Mangan. Eine eminente Rolle für alle lebenden Organismen spielt das Wasser im Boden. Bevor die Organismen im Boden die erforderlichen Wassermengen erreichen, herrscht förmlich ein Kampf unter ihnen. Die Organismen können überhaupt ohne Wasser nicht existieren.

Der Gang der Bodenuntersuchung.

Bei der Probeentnahme des Bodens ist es angezeigt, nicht gemischte Durchschnittsproben einer Ackerfläche, sondern stets charakteristische Einzelproben auszuwählen.

Nach den alten Angaben von *Wahnschaffe* [1]) stellt man zur Entnahme eine viereckige Probegrube her, deren Wände man senkrecht mit einem

[1]) *F. Wahnschaffe*, Anleitung zur wissenschaftlichen Bodenuntersuchung. Verlag von Paul Parey, Berlin 1887.

Spaten absticht. Zunächst wird die Ackerkrume genau bis zu ihrer unteren Grenze aus der Grube ausgehoben, auf ein untergelegtes Laken geschüttet und gleichmäßig mit dem Spaten gemischt. Hiervon entnimmt man dann unter möglichster Auslegung der Wurzelrückstände eine geeignete Probe. In gleicher Weise verfährt man bei der Entnahme des flacheren und tieferen Untergrundes. Zuerst wird man die unmittelbar unter der Ackerkrume befindliche Erdschicht zu berücksichtigen haben, indem man 2 bis 3 *dcm* derselben aushebt. Die Anzahl und Tiefe der ferner dem Untergrunde zu entnehmenden Proben richtet sich ganz nach der Beschaffenheit des Bodenprofils. Will man Proben einer ganzen Schichtenfolge bis zu 2 *m* Tiefe entnehmen, so empfiehlt es sich, da das Auswerfen einer so tiefen Grube in vielen Fällen unbequem und zeitraubend sein würde und ein brauchbarer natürlicher oder künstlicher Anschluß besonders dort, wo es sich um die Untersuchung eng begrenzter Gebiete handelt, nur selten vorhanden sein dürfte, dazu einen 2 *m* langen amerikanischen Tellerbohrer zu verwenden.

Der Tellerbohrer besitzt ein unterbrochenes, aus einzelnen flügelartigen Schneiden bestehendes, spitz zulaufendes Gewinde und wird mittelst Holzgriffes in den Boden hineingeschraubt. Er fördert bei genügender Breite der Schneiden so viel Erde, daß man Proben zur Untersuchung nehmen kann, hat aber den Nachteil, daß er in schweren Böden sehr langsam arbeitet und zwei Mann zur Bedienung erfordert. Eine kräftige Durchfeuchtung des Erdreiches, die, wenn nötig, tags vorher durch Begießen vorzunehmen ist, erleichtert die Bohrarbeit wesentlich; trockener, harter Lehm setzt dem Tellerbohrer einen fast unüberwindlichen Widerstand entgegen. Zu empfehlen sind Bohrer, deren Gestänge durch ein Ergänzungsstück bis auf 2 *m* verlängert werden kann.

Ich muß *Heine*[1]) beipflichten, daß sich neben dem Tellerbohrer noch besser der Löffelbohrer bewährt. Der Löffel, welcher aus bestem Stahl gefertigt sein muß, ist an die Bohrstange angeschweißt und kann, sollte er einmal abbrechen, wieder ergänzt werden. Für agronomische Zwecke genügt ein Satz von zwei Bohrern, von denen der eine 1·10 *m*, der andere 2·10 *m* lang ist. Die Bohrung wird so ausgeführt, daß zunächst der kürzere Bohrer genau senkrecht — eventuell mit Hilfe eines Fadenlotes — auf die von Pflanzenwuchs entblößte Stelle des Bodens aufgesetzt und mit der linken Hand am Handgriff gehalten wird, während die rechte einige kräftige Schläge mittelst Holzhammers auf das verbreiterte obere Ende der Bohrstange, den sog. Amboß, führt. Ist der Bohrer bis zu einem Drittel seiner Länge eingetrieben, so wird er einmal langsam herumgedreht, wobei sich der Löffel mit der Erde füllt. Hierauf hebt man vorsichtig an unter Vermeidung von Stößen, ohne zu drehen und zieht den Bohrer zuletzt ein wenig nach sich zu, also ganz schwach geneigt, so heraus, daß der Löffel

[1]) *E. Heine,* Die praktische Bodenuntersuchung. Verlag von Gebrüder Bornträger, Berlin 1911.

sich außen befindet und die Probe nicht verschüttet wird; zu dem Zwecke muß diese Seite am Amboß markiert sein. Der Inhalt des Löffels läßt das Profil deutlich erkennen; der Befund wird notiert, der Löffel mit Hilfe eines Holzstäbchens völlig entleert, der Bohrer zum zweitenmal in die jetzt schon vorhandene Bohrröhre eingeführt und durch Hammerschläge um ein weiteres Drittel vorgetrieben. Da man beim dritten Male schon 1 *m* Tiefe erreicht, so wird nunmehr der 2 *m*-Bohrer weiter benutzt, der eine etwas geringere Stärke haben soll, um den Reibungswiderstand beim Einführen und Drehen möglichst zu verringern. Beim Aufholen des längeren und dabei schwächeren Bohrers hüte man sich, ihn zu verbiegen; aus dem gleichen Grunde sollte er stets hängend aufbewahrt werden.

I. Bestimmung des hygroskopischen und mechanisch absorbierten Wassers.

20—25 *g* Boden werden einem guten Durchschnittsmuster entnommen und in einem Kölbchen mit Glasstöpsel, welches sich in einem Trockenapparat befindet, bei 110° C zum konstanten Gewicht getrocknet.

II. Bestimmung der Wasserkapazität des Bodens.

Unter „Wasserkapazität" eines Bodens versteht man diejenige Wassermenge, welche ein Boden zurückzuhalten vermag. Dieselbe wird entweder in Gewichtsprozenten der festen Bodenteilchen oder in Prozenten des Bodenvolumens festgestellt.[1])

Josef Kopecký[2]) konstruierte zur Bestimmung der Wasserkapazität einen einfachen Apparat, mittelst dessen es in erster Reihe möglich ist, aus dem Boden eine bestimmte Menge Bodenmasse in jener Lagerung herauszuschneiden, wie sie in der Natur vorkommt.

Dieser Apparat besteht aus einem 20 *cm* hohen Stahlrohr, welches unten mit einer Schneide versehen ist, die durch das Zuschleifen der äußeren Rohrwandung gebildet wurde. Der lichte Durchmesser des Rohres bei seiner Schneide mißt 50·5 *mm*. In der Höhe von etwa 30 *mm* von unten gemessen beträgt der Durchmesser des Stahlrohres inwendig 52·5 *mm*, um in das Stahlrohr kleine Messingringe ganz leicht einschieben zu können, deren lichter Durchmesser ebenfalls 50·5 *mm* beträgt.

Zur Bestimmung der Wasserkapazität ist der Messingring V_1 bestimmt, der sich der Schneide des Stahlrohres am nächsten befindet. Seine Dimensionierung, wie sie in Fig. 215 angegeben ist, ist die folgende:

Höhe 35·0 *mm*, Durchmesser 50·5 *mm*, Inhalt 70·0 cm^3.

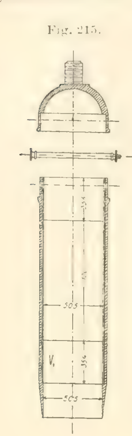
Um diesen Messingring in fester Lage zu erhalten, sind über diesen, wie aus Fig. 215 ersichtlich, noch 2 Zylinder ebenfalls aus Messingblech ein-

[1]) *Eilh. Alfred Mitscherlich*, Bodenkunde für Land- und Forstwirte. Verlag von Paul Parey, Berlin 1905. *E. Ramann*, Bodenkunde. Verlag von Julius Springer. 1910.

[2]) *Josef Kopecký*, Die physikalischen Eigenschaften des Bodens. Prag 1904.

geschoben, der eine von 100 *mm* Höhe und der andere analog mit dem unteren 35·0 *mm* hoch. Der 100 *mm* hohe Messingzylinder wird zur Bestimmung der Durchlässigkeit des Bodens verwendet. Ein eiserner, glockenförmiger Aufsatz, welcher auf das Stahlrohr aufgesetzt und mit ihm durch einen Stift verbunden wird, dient dazu, den ganzen Apparat mit dem Gestänge der Handerdbohrer verbinden zu können. Zu diesem Zwecke ist an dem Aufsatze ein Schraubengewinde eingeschnitten, das mit dem Gewinde der Bohrstangen übereinstimmt; außerdem ist unterhalb des Gewindes ein flacher Ausschnitt zum Ansetzen der Schlüssel angebracht.

Fig. 215.



Es wurde deshalb ein Durchmesser von 50·5 *mm* gewählt, weil bei diesem Durchmesser die Querschnittsfläche fast genau 20 cm^2 beträgt. Einen kleineren Durchmesser als 50 *mm* kann man schon aus dem Grunde nicht wählen, weil bei einem schmäleren Rohre, wie sich *Kopecký* durch viele Versuche überzeugte, beim Eintreiben in den Boden eine so bedeutende Reibung an den Innenwänden entsteht, daß der in das Rohr eindringende Boden zusammengepreßt wird und dadurch seine Struktur sich verändert.

Der Durchmesser von 50 *mm* bildet die untere Grenze, bei welcher Dimensionierung man den Einfluß des Zusammendrückens des Bodens beim Einsenken des Rohres in den Boden vernachlässigen kann. Je größer der Durchmesser des Rohres ist, um so kleiner ist die Deformation in der Bodenstruktur.

Der Durchmesser von 50·5 *mm* wurde auch aus dem Grunde gewählt, weil sich Rohre (Hohlbohrer) in dieser Dimensionierung bei der praktischen Verwendung zur pedologischen Untersuchung ausgedehnter Gebiete in der Natur sehr gut bewährt haben.

Für das Stahlrohr wurde eine Gesammthöhe von 200 *mm* deshalb angenommen, um denselben Apparat zum Herausschneiden eines Bodenkörpers zum Zwecke der Bestimmung einer relativen Durchlässigkeit verwenden zu können.

Für manche Untersuchungen, namentlich der oberen Bodenschichten, verwendete *Kopecký* in neuester Zeit zum Herausschneiden einer bestimmten Bodenprobe ein Stahlrohr (Hohlbohrer) von größerem Durchmesser, und zwar von 80 *mm*.

Die Messingringe, welche eingeschoben werden, hatten folgende Dimensionen:

Durchmesser 80 *mm*, Höhe 40 *mm*, Inhalt 200 cm^3.

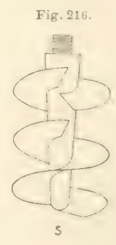
Kopecký konnte also durch diese Anordnung eine Bodenprobe von 200 cm^3 Inhalt erhalten. Die Gesamtkonstruktion ist mit jener von 50·5 *mm* Durchmesser übereinstimmend bis auf den Unterschied, daß dieser große Hohlbohrer keine Vorrichtung zum Anschlusse an ein Bohrgestänge besitzt.

Die Anwendung der beschriebenen Apparate ist eine sehr einfache. Will man z. B. aus der Ackerkrume eine Probe zur Bestimmung der Wasserkapazität herausschneiden, so ist es nicht nötig, den Stahlzylinder mit dem Ansatz und der Spindel des Bohrers zu verbinden, sondern man steckt den Stahlzylinder mit den darin eingeschobenen Messingringen in den Boden derart ein, daß beim Eintreiben die vertikale Richtung eingehalten bleibt. Durch die untere Schneide wird der Bodenzylinder herausgeschnitten, welcher infolge des ganz gleichen inneren Durchmessers des Instrumentes ohne Hindernis ins Innere des Hohlbohrers eindringt, bis dieser fast vollständig mit Boden ausgefüllt ist. Hierauf rüttelt man am Apparate, lockert ihn im Boden und zieht ihn heraus. Durch Eindrücken eines hölzernen Kolbens von ca. 45 *mm* Durchmesser von der Schneide aus, schiebt man die Messingringe samt ihrem Inhalte heraus. Bei etwas Vorsicht kann man mittelst eines gespannten Drahtes oder mit einem scharfen Messer den Inhalt des Ringes V_1 leicht von der übrigen Bodenmasse, die in den anderen Messingringen enthalten ist, abtrennen, so daß das Volumen des Bodenmateriales im Ringe V_1 fast genau 70 cm^3 bzw. beim zweiten Ring 200 cm^3 beträgt.

Zum Schutze dieser Probe im Messingringe bringt man an beiden Enden Siebe aus einem Meßingdraht an, die auf den Ring mittelst Kautschukschleifen befestigt werden.

Wenn dieser Vorgang bei gehöriger Vorsicht durchgeführt wird, läßt sich annehmen, daß man im Messingringe V_1 70 cm^3 Boden in jener Lagerung und Bodenstruktur hat, wie sie sich in einer Tiefe von z. B. 15 *cm* an der Versuchsstelle vorfindet.

Fig. 216.



Ebenso ist es leicht tunlich, eine Probe von 70 cm^3 Inhalt aus einer größeren Tiefe herauszuheben.

Zu diesem Zwecke wird mit einem Bohrer zuerst ein Bohrloch hergestellt. *Kopecký* konstruierte dazu einen Bohrer ohne Spitze, der eigentlich nichts anderes vorstellt, als eine auf eine Achse aufgewickelte Schraubenfläche von 80 *mm* Durchmesser. An seinem unteren Ende trägt derselbe in der ganzen Breite der Fläche eine Schneide *S*, wogegen oben an der Achse löffelförmige Messer angebracht sind (siehe Fig. 216).

Nachdem man nun mit diesem Bohrer in die Erde ein Loch gebohrt hat, kann man den erwähnten röhrenförmigen Apparat leicht in dieses einsenken, indem man früher das Stahlrohr mit Hilfe des glockenförmigen Ansatzes auf die Spindel befestigt hat.

Drückt man genügend auf den Hebel des Bohrers oder schlägt man mit einem hölzernen Hammer von oben darauf, so kann in der Tiefe des vorgebohrten Loches der Hohlbohrer derart in die Erde eingetrieben werden, daß er sich mit dem Boden in jener Lagerung füllt, wie sie in dieser Tiefe vorkommt. Nach erfolgtem Herausheben kann wieder der Inhalt von 70 cm^3 von der übrigen Masse des ausgehobenen Bodens abge-

trennt werden. In dem Falle, wo die Bodenart sehr hart oder festgelagert ist, kann das Herausschneiden des Bodens durch Eingießen von Wasser erleichtert werden.

Diese so erhaltene Bodenprobe von 70 cm^3 Inhalt in Form einer Säule von 35·0 *mm* Höhe läßt man gehörig mit Wasser ansaugen, und zwar auf die Art, daß der Messingring nach Entfernung der Kautschukschleifen in eine Schale mit Wasser gestellt wird. Zur gründlicheren Durchtränkung läßt man auch von oben auf den im Messingringe enthaltenen Boden Wasser herabtropfen.

Nach erfolgter Durchtränkung entsteht nun die Aufgabe, in kurzer Zeit diese Bodenprobe vom überschüssigen Wasser zu befreien, damit darin nur jenes Wasser verbleibt, welches der Boden vermöge seiner physikalischen Eigenschaft, die man Wasserkapazität nennt, ohne jedwede äußere Einwirkung durch eine längere Zeit hindurch in sich zurückzuhalten vermag, etwa in dem Maße, wie es bei seiner natürlichen Lagerung auf dem Acker der Fall ist, wo die betreffende Bodenmenge einen Teil einer größeren Bodensäule bildet.

Behufs leichterer Verständlichkeit sei hier folgendes Beispiel angeführt:

Nach einem ausgiebigen Niederschlag wird die obere Schichte des Bodens durchnäßt, das heißt, alle Bodenzwischenräume füllen sich mit Wasser, das überschüssige Wasser wird aber sofort von den unteren und relativ trockeneren Schichten aufgenommen. Nach dem Regen geben die oberen durchnäßten Schichten das ganze überschüssige Wasser an die unteren Schichten ab und behalten nur jene Wassermenge, die man als „absolute“ Wasserkapazität bezeichnet.

Zur Nachahmung dieser Beispiele, wobei in der Natur in den oberen Schichten des Bodens wirklich die „absolute“ Wasserkapazität eintritt, braucht man bloß die Bodensäule im Messingring V_1 von der Höhe 35·4 *mm*, nachdem sie künstlich mit Wasser gesättigt wurde, ebenfalls auf eine Bodenschichte aufzustellen, aus der sie entnommen wurde und abzuwarten, bis sie das gesamte überschüssige Wasser an die unteren Schichten abgegeben hat. In der Natur dauert dieses Abgeben des überschüssigen Wassers an die unteren Schichten verschieden lange, je nach der Art des mechanischen Baues des Bodens, seiner Lagerung usw. Es wäre jedoch schwierig, jenen Augenblick festzustellen, wann im Boden eine Wassermenge vorhanden ist, die der „absoluten“ Wasserkapazität entspricht; es ist daher zum Zwecke der versuchsweisen Bestimmung der „absoluten“ Wasserkapazität nötig, die Probe rasch und merklich von dem überschüssigen Wasser zu befreien. Dies erreicht man bei den Bestimmungsproben durch die Beachtung des folgenden Vorganges:

Aus dem Territorium, in welchem *Kopecký* arbeitete, entnahm er aus einer Tiefe von etwa 30 *cm* eine größere Menge Boden, ließ ihn an der Luft trocknen und pulverisierte ihn sodann. Hierauf schüttete er dieses Bodenmaterial in eine größere Dose von 8—10 *cm* Höhe, klopfte den Inhalt zusammen und ebnete seine Oberfläche.

Nun stellte *Kopecký* den mit Wasser durchtränkten Bodenkörper, dessen Wasserkapazität er bestimmen sollte, mit dem Messingring V_1 auf das pulverisierte Erdmaterial in die Dose unter Belassung des Messingsiebes auf dem unteren Ende des Ringes. Um auch den Einfluß des Verdunstens möglichst zu beseitigen, wird empfohlen, die Bestimmung in einem etwas kühleren Lokale vorzunehmen. Überdies bedeckte *Kopecký* die Dose mit einer schweren Glasglocke; dadurch wird die Probe ausreichend vor Verdunstung geschützt. Den Messingring mit der Probe läßt man eine längere Zeit hindurch auf dem pulverisierten Boden in der Dose stehen, worauf man ihn auf eine trockene Stelle daselbst übersetzt. Durch wiederholtes Überstellen auf stets trockene Stellen überzeugte sich *Kopecký* nach dem Durchfeuchten der Unterlage, ob noch Wasser aus der Bodenprobe entweicht. Nachdem er auf Grund einer kaum merklichen Durchfeuchtung erkannte, daß fast gar kein Wasser mehr an die untergelegte Schichte abgegeben wird und nachdem er sich auch durch gleichzeitiges Abwiegen überzeugt hatte, daß auch das Gewicht fast konstant bleibt, so konnte er annehmen, daß in dem Versuchszylinder nur jene Wassermenge zurückgeblieben ist, welche diese Bodenart durch eine längere Zeit hindurch in sich zurückzuhalten vermag.[1]) Hierauf wird dieselbe genau abgewogen. Subtrahiert man von diesem Gewicht das Gewicht des den Boden umfassenden Messingringes, so erhält man das reine Gewicht des nassen Bodens von 70 cm^3 Inhalt.

Diese Probe wird hierauf bei 100° C getrocknet und abgewogen. Wird nun dieses Gewicht von jenem im nassen Zustande abgezogen, so erhält man jene Wassermenge, welche in der Probe enthalten war. Gesetzt den Fall, daß diese Differenz z. B. 27·77 *g* ausmacht, so kann man sagen, daß in 70 cm^3 der betreffenden Bodenart 27·77 cm^3 Wasser enthalten sind, was umgerechnet eine Wasserkapazität von $\frac{27 \cdot 70 \times 100}{70} = 39 \cdot 6\,\%$ dem Volumen nach vorstellt.

---

[1]) Nach den Mitteilungen des Prof. Dr. *Kopecký* hat derselbe seine Methode in folgender Art etwas abgeändert. Aus dem untersuchten Territorium nimmt man in den vorerwähnten Messingzylinder statt einer Probe von 70 cm^3, zwei gleiche Muster desselben Volums. Beide Bodenproben werden unter Belassung des unteren Siebes in einer Schale mit Wasser vollständig durchtränkt. Nach völliger Durchnässung wird der eine Messingring auf ein Filtrierpapier gelegt und auf diesem der 2. Ring, in dem die Wasserkapazität zu bestimmen ist, bei Belassung des unteren Siebes, gestellt. Der untere Messingring mit dem in demselben enthaltenen Boden dient dazu, das Wasser, welches der obere Messingring vermöge seiner Wasserkapazität nicht mehr halten kann, abzusaugen und abzuleiten. Das Sieb wird bei dem oberen Ring nur deshalb belassen, damit die durchweichten Bodenproben nicht zusammenkleben. Nachdem das überschüssige Wasser schon abgeführt ist und die Oberflächen gehörig konsistent geworden sind, wird das Sieb entfernt und die Oberflächen beider Bodenproben kommen miteinander in unmittelbare Berührung. Das Absaugen des Wassers geschieht hier genau so wie in der Natur, indem die obere Schichte des natürlich gelagerten Bodens das überschüssige Wasser der unteren Schichte abgibt. Die ganze Manipulation erfolgt in der Weise, indem das Sieb an dem oberen Ring nach 2 Stunden entfernt wird und beide Ringe aufeinander noch 22 Stunden, also im ganzen 24 Stunden belassen werden. Sodann wird der obere Ring gewogen und weiter verfahren wie bereits geschildert wurde.

Weil nun sowohl bei der hygienischen als auch bei der agronomischen Forschung der Inhaltsbegriff bezüglich einer im Boden enthaltenen Wassermenge nach einer Volumseinheit geläufiger ist und aus dem weiteren Grunde, daß bei den verschiedenen spezifischen Gewichten der Bodenarten auch verschiedene Resultate bei der Bestimmung der Wasserkapazität dem Gewichte nach resultieren, so bildet die Wasserkapazität dem Volumen nach, wie oben erwähnt, den am meisten berechtigten Zahlenausdruck für die im Boden enthaltene Wassermenge.

In der Praxis kann zwar auch ein anderer Fall eintreten, wenn es sich z. B. um die Bestimmung der physikalischen Eigenschaften der Böden in Rutschgebieten handelt. Die Ursache der Bodenbewegung bildet oft der Umstand, daß die obere Erdschichte infolge einer größeren Wasserkapazität so beschwert wird, daß sie sich bei einem gegebenen Neigungswinkel und bei der Glätte des Bodens in ihrer Lage nicht erhalten kann und nach abwärts rutscht. Hier kommt also die Vergrößerung des Bodengewichtes infolge der Wasserkapazität zur Geltung.

Nach *Kopeckýs* Ansicht wäre es günstiger, einmal die Größe der Wasserkapazität dem Volumen nach, ein anderes Mal dem Gewichte nach festzustellen. Daraus folgt die Notwendigkeit, dahin zu arbeiten, daß die Größe der Wasserkapazität nicht jedesmal nur dem Volumen, sondern auch dem Gewichte nach bestimmt und angegeben werde.

Bei Benutzung des beschriebenen Apparates ist die Bestimmung der Wasserkapazität dem Gewichte nach aus den bereits ermittelten Angaben eine leichte Aufgabe. Aus dem Gewichte der in 70 *cm*³ Boden enthaltenen Wassermenge und aus dem Gesamtgewichte der Bodenprobe kann man durch einen einfachen rechnerischen Vorgang die verlangte Größe bestimmen.

Wenn man das Gewicht des Wassers, in dem hier angeführten Beispiele 27·77 *g*. durch das Gewicht des bei 100° C ausgetrockneten Bodens, z. B. 92·48 *g*. dividiert und den Quotienten mit 100 multipliziert, so erhält man den Prozentsatz für die Wasserkapazität dem Gewichte nach. In diesem Beispiele hier beträgt also die Wasserkapazität

39·6% dem Volumen nach und
30·0% dem Gewichte nach.

Falls man an einer bestimmten Stelle auf dem Acker-, Garten-, Wald- oder Wiesenboden für einen besonderen Fall die Wasserkapazität bestimmen will, z. B. behufs Feststellung der zur Bewässerung einer bestimmten Parzelle nötigen Wassermenge (Flußwasser oder Abfallwässer), so ist es unbedingt unerläßlich, hierorts einen „Versuch“ auszuführen.

Zu seiner Durchführung verwendet man Stahlrohre von 50 *cm* Länge und 10 *cm* Durchmesser. Das Rohr ist an seinem unteren Ende mit einer Schneide versehen und am oberen Ende mittelst eines stärkeren Ringes gehörig verstärkt. Dieses Rohr schlägt man mit einem hölzernen Hammer vorsichtig in eine Tiefe von ca. 40 *cm* ein. In den herausragenden Teil des Rohres gießt man Wasser ein und sorgt zwei Tage hindurch für stetes Zugießen. Hierauf läßt man das gesamte Wasser einsickern. Nach 24 Stunden vom Augenblicke an, wo das Wasser in den Boden eingesickert ist, treibt

man den oben beschriebenen Apparat zur Bestimmung der Wasserkapazität in den Bodenkörper ein, der sich im erwähnten Rohre vorfindet. Mittelst der bereits hier beschriebenen Methode kann man eine Probe von 70 *cm*³ Inhalt herausnehmen, welche der Wasserkapazität gemäß mit Wasser gesättigt ist.

Wenn man das Gewicht dieser Probe im nassen Zustande, d. h. in jenem Stadium, wie sie aus dem Stahlrohr befördert wurde und dann auch nach dem Austrocknen bei 100° C bestimmt, so erhält man in der Differenz dieser Gewichte jene Wassermenge, welche in den 70 *cm*³ des geprüften Bodens enthalten war. Durch weitere Umrechnung kann, wie bereits angeführt wurde, die Wasserkapazität dieser Bodenart nicht nur dem Volumen, sondern auch dem Gewichte nach in Prozenten angegeben werden.

III. Bestimmung des Wasserdampfes in der Bodenluft.

Die Wasserbestimmung in der Bodenluft kann mit großer Schärfe dadurch ausgeführt werden, daß man gemessene oder gewogene Volumen von Bodenluft durch mit Chlorkalzium und Phosphorsäureanhydrid gefüllte Röhren leitet und deren Gewichtszunahme bestimmt.

Ein sehr praktisch und exakt arbeitender Apparat, welcher die Feuchtigkeit und den Kohlensäuregehalt der Luft direkt volumetrisch genau zu bestimmen vermag, wurde von *Pettersson*[1]) konstruiert.

Zum Aussaugen und Aufbewahren größerer Volumen der Bodenluft bedient man sich zweckmäßig eines Aspirators aus Zinkblech, wie derselbe zu gasanalytischen Arbeiten verwendet wird.

IV. Bestimmung des Sauerstoffes in der Bodenluft.

Der Bedarf an Sauerstoff der Organismen im Boden hängt von der Größe der anwesenden Menge obligater Aërobionten oder obligater Anaërobionten oder fakultativer Aërobionten oder fakultativer Anaërobionten ab. Bei den lebenden Organismen im Boden existiert ein Optimum, Maximum und Minimum der Sauerstoffspannung, d. h., daß sie unter einem bestimmten Sauerstoffpartialdruck am besten gedeihen und verschiedene Empfindlichkeit gegen Variationen desselben besitzen.

In einer durchschnittlichen Gasprobe bestimmt man den Sauerstoff nach folgenden Methoden und zwar:

1. mit dem Kupfereudiometer von *Kreusler*[2]),
2. mit dem Apparat von *O. Lindemann* und
3. mit dem Apparat von *Walter Hempel*.

Diese Methoden werde ich hier nicht näher beleuchten, sondern verweise bloß auf die diesbezüglichen Publikationen von *Walter Hempel*[3]) und *Clemens Winkler*.[4])

---

[1]) *Fresenius*, Zeitschrift f. analyt. Chemie. 25. S. 467 bis 484; siehe *Walter Hempel*, Gasanalytische Methoden. Braunschweig 1900.

[2]) *U. Kreusler*, Landwirtschaftliche Jahrbücher. 1885. S. 333; *Wiedemanns* Annalen der Physik und Chemie. N. F. 6. S. 537.

[3]) *Walter Hempel*, Gasanalytische Methoden. Braunschweig 1900.

[4]) *Clemens Winkler*, Lehrb. d. techn. Gasanalyse. Verlag v. Art. Felix, Leipzig 1901.

V. Bestimmung der Luftkapazität des Bodens.

Unter der Luftkapazität des Bodens versteht man jene Größe, welche das Volumen jener Poren des Bodens angibt, das nach der Sättigung des Bodens mit Wasser bis auf die Höhe der absoluten Wasserkapazität noch immer mit Luft ausgefüllt verbleibt. Mathematisch ausgedrückt ist dies die Differenz zwischen dem Gesamtinhalte der Bodenzwischenräume (Poren) und dem Werte der absoluten Wasserkapazität dem Volumen nach.

Diese Differenz bedeutet also jene „minimale“ Menge Luft, die dauernd oder „absolut“, d. h. auch bei der Sättigung des Bodens mit Wasser in demselben erhalten bleibt.

Schwere, festgelagerte Böden, namentlich Städteböden, die mehr zur Fäulnis als zur Oxydation disponiert sind, haben in der Regel eine geringe Luftkapazität; leichte, lockere Bodenarten weisen einen relativ höheren Prozentsatz von derselben auf.

Nach der Größe der Luftkapazität kann man sich über den Gehalt des Bodens an Sauerstoff leicht ein Urteil bilden.

In Böden, welche eine kleine Luftkapazität besitzen, herrscht ein Mangel an Sauerstoff, wodurch die normalen Dissimilationsprozesse der aëroben Mikroorganismen und des Wurzelsystems der Pflanzen ungemein beeinträchtigt werden. Es treten da gewöhnlich Fäulnisprozesse ein.

Um ein deutlicheres Bild über die Größe der Luftkapazität zu erhalten, ist es zunächst nötig, die Bestimmung des Porenvolumens oder der Porosität des Bodens nach *Kopecký*[1]) näher zu erläutern.

Die Bestimmung der Größe der Porosität ist verhältnismäßig einfach; sie ist nur ein rechnerisches Resultat aus den Werten des scheinbaren und des wirklichen spezifischen Gewichtes.

Wenn z. B. 1 cm^3 Boden keine Poren enthalten würde, so müßte sein Gewicht so groß sein, als das wirkliche spezifische Gewicht ausmacht. In dem tieferstehend angeführten Beispiel also 2·48 *g*.

In Wirklichkeit aber wiegt 1 cm^3 Boden in jener Struktur, in der er sich in der Natur vorfindet, natürlich nach der Entfernung des Wassers, also nach Austrocknung bei 100° C bloß 1·285 *g*, d. h. so viel, als das scheinbare spezifische Gewicht angibt.

Daraus folgt, daß der Inhalt der Poren im Boden durch die Differenz zwischen der Größe des wirklichen und des scheinbaren spezifischen Gewichtes angegeben erscheint, wenn diese Gewichtsdifferenz durch Vergleich mit gleichem Volumen der nichtporösen Bodenart auf eine Volumseinheit überführt wird; zur besseren ziffermäßigen Darstellung wird das Resultat in einen Prozentsatz umgerechnet.

---

[1]) *Josef Kopecký*, Die physikalischen Eigenschaften des Bodens. Prag 1904.

Beispiel:

Wirkliches spezifisches Gewicht	2·480
Scheinbares spezifisches Gewicht	1·285
Unterschied	1·195

1·195 : 2·48 = 0·4818

0·4818 × 100 = 48·18%.

Nachdem das scheinbare spezifische Gewicht (1·285) mit Rücksicht auf die Bodenlagerung, wie sie in der Natur vorkommt, bestimmt wurde, so gibt uns die oben angeführte Größe von 48·18% das Volumen der Bodenzwischenräume (Porosität) in natürlicher Lagerung an.

Aus dem Angeführten ist ersichtlich, daß die Bestimmung der spezifischen Gewichte unbedingt nötig ist; außerdem wird dadurch von neuem bestätigt, daß die einzig richtige Bestimmungsmethode des scheinbaren spezifischen Gewichtes diejenige ist, bei welcher zu jenem Bodenzustand gegriffen wird, wie wir ihn in der Natur vorfinden.

Man kann also behaupten, daß der angeführte Apparat, mit welchem man 70 cm^3 oder 200 cm^3 Boden aus den verschiedenartigen Schichten eines Acker-, Wiesen-, Garten- und Waldbodens herausschneiden kann, ohne dabei die Bodenstruktur wesentlich zu verändern, indirekt sich auch zur Bestimmung der Bodenporosität eignet und mit Vorteil verwendet werden kann.

Die Luftkapazität des Bodens wird, wie folgende Beispiele demonstrieren, in nachstehender Weise berechnet:

I. Beispiel.

Wasserkapazität dem Volumen nach . .	47·60%
Wasserkapazität dem Gewichte nach . .	37·00%
Scheinbares spezifisches Gewicht . . .	1·34%
Wirkliches spezifisches Gewicht	2·58%
Porenvolumen	48·00%

Porenvolumen	48·00%
Wasserkapazität dem Volumen nach . .	47·60%
Differenz	0·40%

Es wurde daher eine Luftkapazität von 0·4% gefunden.

II. Beispiel.

Wasserkapazität dem Volumen nach . .	34·60%
Wasserkapazität dem Gewichte nach . .	25·00%
Scheinbares spezifisches Gewicht . . .	1·34%
Wirkliches spezifisches Gewicht	2·65%
Porenvolumen	49·50%

Porenvolumen	49·50%
Wasserkapazität dem Volumen nach . .	34·60%
Differenz	14·90%

Die hier gefundene Luftkapazität belief sich demnach auf 14·90%. Auf die Bedeutung der Luftkapazität für die biologischen Prozesse im Boden ist im folgenden Kapitel hingewiesen.

VI. Versuch behufs Eruierung, ob die organischen Substanzen im Boden den Heterotrophen als eine gute Kohlenstoffnährquelle dienen.

Die organischen Substanzen im Boden bilden ein Gemenge abgestorbener und zersetzter organischer Stoffe pflanzlichen und tierischen Ursprungs. Dieses Gemenge besitzt eine sehr komplizierte Zusammensetzung, welche von der Tiefe der Zersetzung organischer Reste, wie Wurzelresten, Stoppeln, abfallender Zweige, Blätter, Nadeln, Blüten, Samenschalen, abgestorbener niederer Pflanzen und Leiber der Tiere, die im Boden ihren Wohnsitz hatten, abhängt. Bei den Ackerböden kommen hier namentlich die organischen Teile der Düngemittel in Betracht. Alle diese organischen Substanzen befinden sich im Acker-, Wiesen-, Wald- und Gartenboden in ganz verschiedenen Stadien der Zersetzung.

Der Kohlenstoff macht den größten Teil der organischen Substanzen der Bodenorganismen aus. Nach unseren Untersuchungen enthalten die Mikroorganismen im Boden 44—55% Kohlenstoff, welches uns zu der Annahme berechtigt, daß der Kohlenstoffbedarf am größten ist. Wir unterscheiden im Boden zweierlei Arten von Organismen, und zwar die autotrophen und heterotrophen Organismen. Die autotrophen Organismen assimilieren fast ihren gesamten Nährstoffbedarf aus den anorganischen Bestandteilen des Bodens und sind in ihrer Ernährung von anderen Organismen beinahe ganz unabhängig.[1]) Es findet ja im Boden selbst ein Kreislauf des Kohlenstoffes statt, indem die Nitrobakterien und die von *Kaserer* entdeckten Wasserstoffbakterien Kohlensäure assimilieren. Die heterotrophen Organismen hingegen können ohne den autotrophen Organismen im Boden nur schwer existieren.

Im Boden kommen nachstehende Gruppen von Bakterien vor:

1. Bakterien, die ebenso wie die grünen Pflanzen weder organischer Kohlenstoffquellen noch organischer Stickstoffquellen bedürfen. Diese sogenannten autotrophen Bakterien können sowohl Kohlenhydrate als auch Proteinstoffe aus Kohlensäure und anorganischen Salzen aufbauen.

2. Bakterien, die organischer Kohlenstoffquellen bedürfen, die aber organischer Stickstoffquellen entbehren können. Diese Bakterien vermögen Proteinstoffe aus Kohlenhydraten (oder organischen Säuren), aus elementarem Stickstoff, Stickstoffmonoxyd, Stickstofftrioxyd, Stickstoffpentoxyd und Ammoniak aufzubauen.

3. Bakterien, die ebenso wie die Tiere sowohl organischer Kohlenstoffquellen als auch organischer Stickstoffquellen bedürfen. Diese Bakterien können aus anorganischer Substanz weder die Kohlenhydrat- noch die Eiweißsynthese vornehmen.

[1]) *Orla Jensen,* Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Zentralblatt für Bakteriologie etc. II. Abt. Bd. 22. Nr. 11/13. 1909.

Durch die Bestimmung der organischen Substanzen im Boden auf chemischem Wege wird bloß die Menge des Kohlenstoffes festgesetzt; aber zur Eruierung der Qualität der Kohlenstoffnährquelle, ob sich dieselbe für den Aufbau neuer lebender Zellen und für ein gutes Respirationsmaterial für die heterotrophen Organismen eignet, hat uns bis jetzt noch die richtige Methode gefehlt. Zur Feststellung der Abbaufähigkeit der organischen Substanzen empfiehlt es sich, unsere biochemische Methode in Anwendung zu bringen. Bevor ich noch zur Beschreibung unserer neuen biochemischen Methode schreite, erwähne ich einige Methoden zur Bestimmung der organischen Substanzen im Boden.

Nachdem man über den chemischen Charakter der organischen Substanzen im Boden bisher keine genaue Kenntnis besitzt, ist es am besten, ihre Menge durch den gefundenen Kohlenstoff auszudrücken.

Die Bestimmung des Kohlenstoffes erfolgt entweder durch die Elementaranalyse oder nach der *Knop*schen Methode. Diese letztere beruht darauf, den in den organischen Substanzen enthaltenen Kohlenstoff durch die Oxydation mit Chromsäure in Kohlensäure zu verwandeln und letztere in wägbaren Absorptionsapparaten aufzufangen.

Durch diese beiden Methoden ist es uns möglich, die Menge des Kohlenstoffes in der Trockensubstanz des Bodens exakt zu bestimmen.

* * *

Die Bakterien und Schimmelpilze finden in den im Boden vorhandenen organischen Substanzen

1. ein Material zum Aufbau neuer lebender Materie der Bakteriensubstanz und

2. ein Respirationsmaterial.

Durch den Verlauf der Lebensprozesse der Bakterien und Schimmelpilze werden die organischen Substanzen, und zwar die Pentosen (l-Arabinose, l-Xylose), Hexosen (Glukose, Galaktose, Fruktose), Disacchariden (Saccharose, Maltose), Polysacchariden (Araban, Xylan, Stärke, Glykogen, Galaktane, Pektinstoffe, Zellulose), Humusstoffe und in neutraler Form vorhandene organische Säuren mineralisiert und in die Endprodukte: Kohlendioxyd, Methan, Wasserstoff (eventuell Wasser) und bei den stickstoffhaltigen Körpern neben Kohlendioxyd, Methan und Wasserstoff noch in Ammoniak, Merkaptane und Schwefelwasserstoff umgewandelt.

Bei stark beschränktem Luftzutritte erfolgt Fäulnis, bei welch letzterer die Mineralisierung der organischen Substanzen, speziell bei Gegenwart stickstoffhaltiger organischer Verbindungen, viel langsamer vor sich geht. Namentlich bei Übersättigung des Bodens mit organischen Substanzen und ungenügendem Sauerstoffzutritt kommen die anaërobiotischen Prozesse zum Vorschein. Wir fanden, daß in allen Böden, in denen die Luftkapazität unter 2% sinkt, die anaërobiotischen Atmungsprozesse in den Vordergrund treten. In Städteböden, welche namentlich mit organischen Substanzen übersättigt sind, werden die aërobiotischen Prozesse der Hetero-

trophen unterdrückt. In solchen Fällen ist die Bodenatmosphäre verhältnismäßig reich an Kohlensäure und Schwefelwasserstoff und infolgedessen geht die Zersetzung der organischen Substanzen langsam vor sich. Wenn eine größere Menge, und zwar 15—30 Vol. ‰ Kohlensäure in der Bodenluft vorhanden sind, so ist das aber noch kein Beweis, daß eine große Oxydation der organischen Substanzen durch die Heterotrophen stattgefunden hat, im Gegenteil in einer solchen Atmosphäre geht die Oxydation der organischen Substanzen sehr langsam vor sich. Wir müssen immer darauf achten, wieviel von den Mikroorganismen in 1 *kg* Boden bei Sauerstoffzutritt und Sauerstoffabschluß innerhalb einer bestimmten Zeit, Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt, Kohlendioxyd gebildet wird. Die Menge des sich im Acker-, Wiesen-, Garten- und Waldboden bildenden Kohlendioxyds variiert ungemein und hängt von der Quantität der leicht abbaufähigen Kohlenhydrate, der stickstoffhaltigen organischen Substanzen, von der Art und Aktivität der Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen), von dem sauren, neutralen sowie alkalischen Charakter des Bodens und von der Luftkapazität des Bodens ab.

Ein Indikator der Atmungsintensität[1]) der in verschiedenartigen Böden vorhandenen Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) bei vollem Luftzutritt ist also die von denselben in 1 *kg* Boden bei gleicher Temperatur und bei gleichem Feuchtigkeitsgehalt ausgeschiedene Menge des Kohlendioxyds. Diese ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds bei vollem Luftzutritt zeigt uns die Lebensenergie der Bakterien sowie die Abbaufähigkeit der organischen Substanzen im Boden. In den organischen Substanzen finden die Heterotrophen nicht nur ein Energiematerial für ihren Atmungsprozeß, sondern auch eine Kohlenstoff- und Stickstoffnährquelle für den Aufbau neuer lebender Materie.

Seit mehreren Jahren ist es unsere Aufgabe, die Atmungsintensität der Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in unseren Acker-, Wiesen-, Wald- und Gartenböden zu erforschen. Unsere diesbezüglichen Versuche resultierten, daß die Atmungsintensität der Mikroorganismen ungemein variiert und von nachstehenden Faktoren abhängig ist:

1. Von der Luft- und Wasserkapazität des Bodens.
2. Von der Anzahl der aktiven Auto- und Heterotrophen.

---

[1]) Schon im Jahre 1905 habe ich auf den Ursprung, die Menge und die Bedeutung des Kohlendioxyds im Boden aufmerksam gemacht (siehe Zentralblatt für Bakteriologie etc. 1905). In meinen weiteren Arbeiten, und zwar „Über die Wirkung des Stallmistes“, Zeitschrift für landwirtschaftliches Versuchswesen in Österreich 1907, sowie „Beitrag zur Kenntnis der Stickstoffanreicherung des Bodens durch Bakterien und ihre Bedeutung für die Pflanzenernährung“, Deutsche landwirtschaftliche Presse, Berlin 1908 und in meinem Werk „Biochemischer Kreislauf des Phosphat-Ions im Boden“, Verlag von Gustav Fischer, Jena 1911, habe ich auf Grund meiner zahlreichen schon früheren Forschungen auf die Wichtigkeit der Kohlensäureproduktion durch Bakterien hingewiesen. Die Arbeiten von *Hesselink van Suchtelen* (Zentralblatt für Bakteriologie. II. Abt. Bd. 28. S. 45) muß man daher bloß als eine Fortsetzung meiner Studien ansehen.

3. Von der chemischen Zusammensetzung und Menge der organischen Substanzen im Boden.

4. Von der Abbaufähigkeit der organischen Substanzen.

5. Von der chemischen Reaktion der Böden.

6. Von der mechanischen Bearbeitung des Bodens.

7. Von der Art der Düngung.[1])

8. Von der Art der Kulturpflanzen, mit welchen der Boden bebaut ist.

Ich führe hier aus den Ergebnissen der von uns angestellten mehrjährigen Versuche einige Daten an, um zu veranschaulichen, wie die Atmungsintensität der Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) im Boden, bei einer ungleichen Abbaufähigkeit der organischen Substanzen, grundverschieden ist. Vorerst lasse ich die Zahlen bezüglich der Atmungsintensität der Mikroorganismen aus verschiedenen Bodentiefen folgen:

Zu unseren Versuchen wählte ich einen gleichmäßig beschaffenen Lehmboden in der Nähe eines Waldes von *Poboř*. Ein kleiner Teil hiervon war nicht mechanisch bearbeitet, überhaupt nie gedüngt, nicht bestellt und diente als Weide. Ein großer Teil war seit Jahren mechanisch bearbeitet, mit künstlichen Düngemitteln gedüngt und mit Kulturpflanzen bebaut. Im Jahre 1902 wurde eine Parzelle davon mit Zuckerrüben und eine Parzelle mit Klee bestellt. An mehreren Stellen dieser drei Parzellen wurden breite Gruben gemacht und aus verschiedenartigen Tiefen, und zwar bis zu einer solchen von 10—20 *cm*, 20—30 *cm*, 30—50 *cm*, 50—80 *cm* und 80 bis 100 *cm* Proben aus denselben entnommen. Behufs Keimzahlbestimmung wurden dann aus diesen verschiedenartigen Tiefen unter Beibehaltung aller bakteriologischen Kautelen mit einem sterilisierten *Fränkel*schen Bohrer Muster aus den Wänden der Grube genommen. Die Keimzahlbestimmung vollzog man bei einer konstanten Temperatur von 20° C. Aus den von mehreren Stellen und verschiedenartigen Tiefen gewonnenen Mustern wurden dann gewisse Teile genommen, um die Atmungsintensität feststellen und auch die Abbaufähigkeit der organischen Substanzen studieren zu können. Hierbei wurden folgende durchschnittliche Daten nach 20tägiger Beobachtung ermittelt:

Lehmboden eines schwach sauren Charakters von einer Weide, welcher bis jetzt nicht mechanisch bearbeitet, überhaupt nie gedüngt und nicht bestellt wurde. Die Menge des von den Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in 1000 *g* Boden mit 25% Wasser bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmeten Kohlendioxyds:

---

[1]) Durch unsere Versuche wurde festgestellt, daß das Kalziumoxyd, sowie Kalziumkarbonat den Abbau der organischen Substanzen ungemein fördert. Die Atmungsintensität der Böden wird durch mäßige Kalkdüngung sehr gesteigert. In der neuesten Arbeit „Untersuchungen über die Zersetzung der Kohlenstoffverbindungen verschiedener organischer Substanzen im Boden, speziell unter dem Einfluß von Kalk" (Landw. Jahrbücher, 1911) sind *O. Lemmermann*, *K. Aso*, *H. Fischer* und *L. Fresenius* zu denselben Resultate gekommen.

			Produzierte Menge des Kohlendioxyds
Bodenschichte von 10— 20 *cm*.	Keimzahl pro 1 *g* Boden	230.000	16·5 *mg*
„ „ 20 30 „	„ „ 1 „ „	256.000	19·4 „
„ „ 30— 50 „	„ „ 1 „ „	208.000	9·8 „
„ „ 50— 80 „	„ „ 1 „ „	14.000	3·3 „
„ „ 80—100 „	„ „ 1 „ „	5.000	2·1 „

Lehmboden ein und desselben Ursprungs wie der von der angrenzenden Weide, nur mit dem Unterschiede, daß er gründlich mechanisch bearbeitet, mit künstlichen Düngemitteln gedüngt und im Versuchsjahr mit Klee bebaut wurde. Die Menge des von den Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in 1000 *g* Boden mit 25% Wasser bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmeten Kohlendioxyds:

			Produzierte Menge des Kohlendioxyds
Bodenschichte von 10— 20 *cm*.	Keimzahl pro 1 *g* Boden	1.800.000	38·6 *mg*
„ „ 20 — 30 „	„ „ 1 „ „	2.350.000	38·8 „
„ „ 30— 50 „	„ „ 1 „ „	1.600.000	20·2 „
„ „ 50— 80 „	„ „ 1 „ „	540.000	6·3 „
„ „ 80—100 „	„ „ 1 „ „	72.000	2·7 „

Lehmboden eines schwach alkalischen Charakters, sonst aber ein und desselben Ursprungs wie der von der angrenzenden Weide, nur mit dem Unterschiede, daß er jedes Jahr gründlich mechanisch bearbeitet, mit Stallmist und künstlichen Düngemitteln gedüngt und im Versuchsjahr mit Zuckerrüben bebaut wurde.

Die Menge des von den Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in 1000 *g* Boden mit 25% Wasser bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmeten Kohlendioxyds:

			Produzierte Menge des Kohlendioxyds
Bodenschichte von 10— 20 *cm*.	Keimzahl pro 1 *g* Boden	4.700.000	47·5 *mg*
„ „ 20 — 30 „	„ „ 1 „ „	3.529.000	49·7 „
„ „ 30 50 „	„ „ 1 „ „	2.100.000	28·5 „
„ „ 50— 80 „	„ „ 1 „ „	184.000	6·6 „
„ „ 80—100 „	„ „ 1 „ „	95.000	2·3 „

Die Atmungsintensität der Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser in 24 Stunden bei 20° C in der Aërobiose steht in einem gewissen Zusammenhange mit der Anzahl der im Boden vorhandenen Bakterien.

Lenken wir vorerst unser Augenmerk dem Lehmboden von der Weide zu, so sehen wir, daß die von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden aus einer Tiefe von 10—30 *cm* ausgeatmete Menge Kohlendioxyds 16·5—19·4 *mg* beträgt. Bei einer Bodentiefe von 30—50 *cm* sinkt dieselbe schon auf 9·8 *mg* und bei 50—80 *cm* Tiefe finden wir schon nur eine solche von 3·3 *mg*; bei einer Bodentiefe von 80—100 *cm* beziffert sich diese nur mehr auf 2·1 *mg*.

Der Boden, welcher mit Klee bebaut wurde, weist eine mehr als doppelt so große Atmungsintensität auf. Hier belief sich die von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden aus einer Tiefe von 10—30 *cm* ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds lauf 38·6—38·8 *mg*. Bei einer Bodentiefe von 30—50 *cm* sinkt diese schon auf 20·2 *mg* und bei einer Tiefe von 50—80 *cm* auf 6·3 *mg*. Bei einer Bodentiefe von 80—100 *cm* beträgt dieselbe nur mehr 2·7 *mg*.

Bei der Parzelle, welche mit Zuckerrübe bebaut wurde, macht sich eine staunenswerte Atmungspotenz der Bakterien bemerkbar. Da belief sich die von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden aus einer Tiefe von 10—30 *cm* ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds auf 47·5—49·7 *mg*, war also fast dreimal so groß als bei dem Lehmboden, welcher als Weide diente. Bei einer Tiefe von 30—50 *cm* betrug die Menge nur mehr 28·5 *mg* und bei einer Tiefe von 50—80 *cm* 6·6 *mg*. Bei einer Bodentiefe von 80—100 *cm* bezifferte sich die ausgeatmete Kohlendioxydmenge bloß auf 2·3 *mg*.

Wie aus diesen Daten erhellt, sinkt in den tieferen Bodenschichten von 50 *cm* angefangen die Atmungsintensität der Bakterien rapid und sind bei einer Tiefe von 80—100 *cm* nur mehr Spuren ausgeatmeten Kohlendioxyds zu konstatieren.

Diese geringen Mengen des ausgeschiedenen Kohlendioxyds (2 *mg*) bewegen sich schon in den Grenzen eines Versuchsfehlers. Aus meinen Versuchsresultaten läßt sich folgern, daß es bei der Atmungsintensität der Mikroorganismen im Boden eine große Rolle spielt, ob der Boden mechanisch bearbeitet, gedüngt und bebaut ist oder nicht. Ferner ist es auch nicht gleichgültig, mit welcher Gattung von Kulturpflanzen der Boden bestellt ist. Wir konnten bei dem Boden, welcher mit Zuckerrübe bestellt war, eine größere Atmungsenergie der Mikroorganismen beobachten, als bei dem mit Klee bebauten. Das Kleefeld wurde drei Jahre nicht geackert und gelockert und man konnte in diesem Boden ein Sinken des Poren- und Luftgehaltes bemerken. Wir haben in allen drei Böden die Luftkapazität bestimmt und gefunden:

1. Bei dem Lehmboden von einer Weide, welcher bis jetzt nicht mechanisch bearbeitet, überhaupt nie gedüngt und nicht bebaut wurde, war eine Luftkapazität von 5·8% zu konstatieren.

2. Der Lehmboden, welcher gründlich mechanisch bearbeitet, mit künstlichen Düngemitteln gedüngt und mit Klee bebaut wurde, wies eine Luftkapazität von 10·3% auf.

3. Bei dem Lehmboden, welcher jedes Jahr gründlich mechanisch bearbeitet, mit Stallmist und künstlichen Düngemitteln gedüngt war und mit Zuckerrübe bebaut wurde, war eine Luftkapazität von 23·7% nachzuweisen.

Die gefundene Menge der Luftkapazität steht mit der Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds im vollen Einklang. Je größer die Luftkapazität, desto größer die Atmungsintensität der Mikroorganismen im Boden.

Um uns nun zu überzeugen, ob die im Boden vorhandenen organischen Substanzen für die Heterotrophen eine gute Kohlenstoffnährquelle sind, haben wir nachstehende Versuche ausgeführt:

Von den früher erwähnten drei Bodenarten wurden Durchschnittsmuster bis zu einer Tiefe von 30 *cm* genommen und darin der Kohlenstoff bestimmt.

I. Parzelle.

Der Lehmboden eines schwach sauren Charakters von einer Weide, welcher bis jetzt nicht mechanisch bearbeitet, überhaupt nie gedüngt und nicht bestellt wurde, enthält in der Feinerde 1·98% Kohlenstoff.

II. Parzelle.

Der Lehmboden ein und desselben Ursprungs wie der von der angrenzenden Weide, nur mit dem Unterschiede, daß er gründlich mechanisch bearbeitet, mit künstlichen Düngemitteln gedüngt und im Versuchsjahr mit Klee bebaut wurde, enthält in der Feinerde 2·04% Kohlenstoff.

III. Parzelle.

Der Lehmboden eines schwach alkalischen Charakters, sonst aber ein und desselben Ursprungs wie der von der angrenzenden Weide, nur mit dem Unterschiede, daß er jedes Jahr gründlich mechanisch bearbeitet, mit Stallmist und künstlichen Düngemitteln, namentlich mit Kalk gedüngt und im Versuchsjahr mit Zuckerrübe bebaut wurde, enthält in der Feinerde 2·23% Kohlenstoff.

Von jedem einzelnen dieser drei Durchschnittsmuster wurde 1 *kg* Boden weggenommen, in Glaszylinder geschüttet, und zwar entfielen für jede Bodenprobe zwei Zylinder, also wurden für alle drei Parzellen insgesamt sechs Zylinder angefertigt. Alle diese Zylinder mit Boden wurden bei Dampf im Autoklav gründlich sterilisiert und sodann bei 80° C getrocknet. Von drei Zylindern wurde eine kleine Menge des Bodens herausgenommen und darin der Wassergehalt bestimmt. Für die übrigen Zylinder wurden 10 *g* frischer Rindviehexkremente mit so viel destilliertem und sterilem Wasser (200—250 cm^3) gemischt, daß die Bodenprobe in dem Atmungszylinder 25% Wasser enthält. Natürlich wurde dann der Boden mit den im Wasser vorhandenen Rindviehexkrementen gut durcheinander gemengt.

10 *g* frischer Rindviehexkremente produzieren innerhalb 24 Stunden nach 20tägiger Beobachtung, bei 20° C, bei Durchleitung von steriler Luft, also in aërobiotischem Zustande durchschnittlich 14 *mg* CO_2, bei Durchleitung von Wasserstoff, also in anaërobiotischem Zustande, durchschnittlich 8 *mg* CO_2.

I. Parzelle.

Lehmboden eines schwach sauren Charakters von einer Weide, welcher bis jetzt nicht mechanisch bearbeitet, überhaupt nie gedüngt und nicht bestellt wurde.

Die Menge des von den Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in 1000 *g* sterilisiertem Boden, welcher mit Rindviehexkrementen gemischt war und 25% Wasser enthält, bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmeten Kohlendioxyds betrug nach 20tägiger Beobachtung durchschnittlich 28·6 *mg*, bei Durchleitung von Wasserstoff 13·3 *mg*.

II. Parzelle.

Lehmboden ein und desselben Ursprungs wie der von der angrenzenden Weide, nur mit dem Unterschiede, daß er gründlich mechanisch bearbeitet, mit künstlichen Düngemitteln gedüngt und im Versuchsjahr mit Klee bebaut wurde.

Die Menge des von den Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in 1000 *g* sterilisiertem Boden, welcher mit Rindviehexkrementen gemischt war, und 25% Wasser enthält, bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmeten Kohlendioxyds belief sich nach 20tägiger Beobachtung durchschnittlich auf 36·5 *mg*, bei Durchleitung von Wasserstoff auf 14·5 *mg*.

III. Parzelle.

Lehmboden eines schwach alkalischen Charakters, sonst aber ein und desselben Ursprungs wie der von der angrenzenden Weide, nur mit dem Unterschiede, daß er jedes Jahr gründlich mechanisch bearbeitet, mit Stallmist und künstlichen Düngemitteln, namentlich mit Kalk gedüngt und im Versuchsjahr mit Zuckerrübe bebaut wurde.

Die Menge des von den Mikroorganismen (Auto- und Heterotrophen) in 1000 *g* sterilisiertem Boden, welcher mit Rindviehexkrementen gemischt war und 25% Wasser enthält, bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmeten Kohlendioxyds beträgt nach 20tägiger Beobachtung durchschnittlich 68·2 *mg*, bei Durchleitung von Wasserstoff 27·7 *mg*.

Trotzdem der Kohlenstoffgehalt aller 3 Parzellen fast gleich ist, denn er betrug bei der I. Parzelle 1·98%, bei der II. 2·04% und bei der III. 2·23%, ergeben sich doch bedeutende Unterschiede in dem chemischen Charakter der organischen Substanzen.

Hier ist zu ersehen, daß die organischen Substanzen sich nicht immer zu einer gleich guten Kohlenstoffnährquelle für die Mikroorganismen eignen. Wir fanden, daß bei der I. Parzelle die Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds binnen 24 Stunden bei vollem Luftzutritt 28·6 *mg*, bei der II. Parzelle 36·5 *mg* und bei der III. Parzelle 68·2 *mg* beträgt. Die Menge des von den Mikroorganismen in verschiedenartigen frischen Böden ausgeatmeten Kohlendioxyds ist noch immer kein sicheres Kriterium für die Abbaufähigkeit der organischen Substanzen im Boden. Erst dann, wenn man die Bakterien und Schimmelpilze im Boden durch gründliches Sterilisieren vernichtet und hierauf den sterilisierten Boden mit der gleichen Menge von Bakterien

derselben Virulenz impft, ist es möglich, aus der Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds auf die Abbaufähigkeit der organischen Substanzen zu schließen.

Ich lasse hier noch andere Versuchsresultate folgen.

1. Ein fetter undurchlässiger Tonboden mit einer Luftkapazität von 0·6%.

In der Feinerde befanden sich 1·68% Kohlenstoff.

Die von den Mikroorganismen aus 1 *kg* dieses Bodens mit 25% Wasser bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds beträgt 8·2 *mg*.

Wenn man zu 1 *kg* sterilen Bodens 10 *g* Rindviehexkremente zusetzt, so werden bei vollem Luftzutritt innerhalb der gleichen Zeit und Temperatur 14 *mg* Kohlendioxyd ausgeatmet.

2. Ein diluvialer Lehmboden mit einer Luftkapazität von 7·3%.

Die Feinerde enthielt 2·12% Kohlenstoff.

Die von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds beläuft sich auf 14·6 *mg*.

Nach Zusatz von 10 *g* Rindviehexkrementen zu 1 *kg* des sterilen Bodens werden bei vollem Luftzutritt innerhalb der gleichen Zeit und Temperatur 27·8 *mg* Kohlendioxyd ausgeatmet.

3. Ein angeschwemmter Boden mit einer Luftkapazität von 18·2%.

Der Kohlenstoffgehalt der Feinerde beträgt 1·73%.

Die von den Mikroorganismen aus 1 *kg* dieses Bodens mit 25% Wasser bei 20° C in 24 Stunden bei vollem Luftzutritt ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds bezifferte sich auf 36·6 *mg*.

Als zu 1 *kg* sterilen Bodens 10 *g* Rindviehexkremente zugesetzt wurden, sind binnen derselben Zeit und Temperatur bei vollem Luftzutritt 59·8 *mg* Kohlendioxyd ausgeatmet worden.

Die gewonnenen Resultate sind gewiß äußerst interessant. Der fette, undurchlässige Tonboden enthält organische Substanzen in schwer abbaufähigen Formen. Wir fanden, daß die Produktion an Kohlendioxyd in 24 Stunden vor und nach der Impfung die gleiche blieb. Der diluviale Lehmboden enthielt fast dieselbe Menge Kohlenstoff wie der fette, undurchlässige Tonboden, doch waren daselbst die organischen Substanzen in leichter abbaufähigen Formen anwesend, als in dem ersteren Boden. Vor der Impfung wurden nach 24 Stunden 14·6 *mg* Kohlendioxyd produziert, welche Menge durch die Impfung auf 27·8 *mg* gestiegen ist. Daraus läßt sich schließen, daß im Boden vor der Impfung wenig aktive Bakterien zugegen waren. Der angeschwemmte Boden mit einer Luftkapazität von 18·2% enthielt organische Substanzen in leicht abbaufähigen Formen, trotzdem dessen Kohlenstoffgehalt fast derselbe war wie beim fetten, undurchlässigen Tonboden. Wir konnten hier binnen 24 Stunden eine Kohlendioxydproduktion im ungeimpften Boden von 36·6 *mg*, bei dem geimpften Boden von 59·8 *mg* konstatieren.

Die starke Produktion an Kohlendioxyd ist ein Dokument, daß im Boden nicht nur leicht abbaufähige organische Substanzen vertreten sind, sondern daß dort die Bakterien in voller Aktivität vorhanden sind.

Ich betone hier noch, daß die Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds pro 24 Stunden eine Durchschnittszahl nach 20tägiger Beobachtung ist.

In der Intensität der Atmung der Mikroorganismen im Boden sind, wie bereits erwähnt, auffallende Verschiedenheiten zu konstatieren, und zwar hängen diese, wie wir gesehen haben, von gewissen Faktoren, namentlich von der Menge und Qualität sowie Aktivität der Bakterien und von der Quantität und Beschaffenheit der organischen Substanzen im Boden ab.

Setzt man nun den Fall, daß die in 1 *kg* Ackerkrume bis zu einer Tiefe von 40 *cm* enthaltenen Mikroorganismen innerhalb 24 Stunden nur 15 *mg* CO_2 ausatmen (welche Quantität bei Waldböden und Gartenböden bis viermal größer ist), so ergibt sich bei einer Lehmbodenmasse von 5.000.000 *kg*, die 1 *ha* Ackerboden von einer Schichthöhe von 40 *cm* durchschnittlich wiegt, ein von diesen Organismen ausgeatmetes Kohlendioxydquantum von 75 *kg* pro Tag, was, wenn man nur 200 Tage im Jahr rechnet, an welchen die Temperatur eine mittlere Höhe von 15° C erreicht, 150 Meterzentner oder 7.500.000 *l* Kohlendioxyd in dieser Zeit ausmacht. Die von den Bakterien ausgeatmeten großen Quantitäten Kohlendioxyds wirken bei der Herstellung der für den „garen" Boden besonders eigentümlichen feinkrümeligen Struktur mit. Diese Daten lassen somit keinen Zweifel über die Wichtigkeit zu, welche der Atmung der Mikroorganismen bei der Bildung des Kohlendioxyds im Boden zukommt.

Nimmt man weiter an, daß die Schichte des Bodens bei einer Tiefe von 30 *cm* ein Gewicht von 4.000.000 *kg* aufweist, so kommt 1 *kg* Boden fast mit 1·5 *l* Kohlendioxyd in Berührung.

Das vom Bodenwasser absorbierte Kohlendioxyd überführt langsam, aber nachhaltig die im Wasser schwerlöslichen Di-, Tri- und Tetraphosphate in wasserlösliche Verbindungen der Phosphorsäure.

Die wasserunlöslichen Kalium-, Natrium-, Kalzium- und Magnesium-Silikate werden ebenfalls in wasserlösliche Formen umgewandelt.

Auch die chemische Zusammensetzung der Drainwässer liefert uns einen Beitrag zur Erkenntnis der biologischen Vorgänge im Boden.

Ich führe hier einige Beispiele an über die Wirkung der Sekrete der Auto- und Heterotrophen auf das Löslichwerden der im Boden vorhandenen Phosphate.

Zum Studium wurden folgende Böden herangezogen:

I. Angeschwemmter Lehmboden von Polička, entstanden aus der Urgebirgsformation.

Die Ackerkrume in der Feinerde enthielt an in Salzsäure löslichem

$CaO = 0·023\%$.

$P_2O_5 = 0·024\%$.

Außerdem enthielt der Boden Spuren von CO_2.

In einer 2%igen $C_6H_8O_7$-Lösung werden aufgelöst:

von $P_2O_5 = 0·008$%.

Kohlenstoff = 1·71%.

Der Untergrund in der Feinerde enthielt an in Salzsäure löslichem

$CaO = 0·31$%.

$P_2O_5 = 0·036$%.

Nebstdem enthielt der Boden Spuren von CO_2.

II. Tonboden von Kouřim (in der Richtung gegen Schwarz-Kosteletz), entstanden aus der Urgebirgs- und Permformation.

Die Ackerkrume in der Feinerde enthielt an in Salzsäure löslichem

$CaO = 0·594$%.

$P_2O_5 = 0·087$%.

Außerdem enthielt der Boden Spuren von CO_2.

In einer 2%igen $C_6H_8O_7$-Lösung werden aufgelöst:

von $P_2O_5 = 0·0074$%.

Kohlenstoff 1·19%.

Der Untergrund enthielt in der Feinerde an in Salzsäure löslichem

$CaO = 0·630$%.

$P_2O_5 = 0·125$%.

Außerdem enthielt der Boden Spuren von CO_2.

III. Angeschwemmter Kalkboden von Leitomischl.

Die Ackerkrume enthielt in der Feinerde an in Salzsäure löslichem

$CaO = 11·34$ %.

$P_2O_5 = 0·226$%.

Nebstdem enthielt der Boden 8·12% = CO_2.

In einer 2%igen $C_6H_8O_7$-Lösung werden aufgelöst:

von $P_2O_5 = 0·019$%.

Kohlenstoff 0·94%.

IV. Humusboden von Poděbrad (in der Richtung gegen Königstadtl).

Die Ackerkrume enthielt in der Feinerde an in Salzsäure löslichem:

$CaO = 0·23$ %,

$P_2O_5 = 0·008$%.

Der Boden enthielt auch 0·100% = CO_2.

Kohlenstoff 5·54%.

Zur chemischen Analyse wurden stets 10—20 *l* Wasser abgedampft.

In 100.000 *g* Drainwasser waren folgende Quantitäten von Phosphorsäureanhydrid enthalten:

I. Aus dem angeschwemmten Lehmboden der Urgebirgsformation von Polička 0·062 *g*.

II. Aus dem Tonboden der Urgebirgsformation von Kouřim 0·042 *g*.

III. Aus dem Kalkboden von Leitomischl 0·070 *g*.

IV. Aus dem Humusboden von Poděbrad 0·101 *g*.

Nimmt man nun im allgemeinen eine durchschnittliche Menge Drainwasser von 0·27 *l* pro Sekunde und Hektar Ackerboden an, so wurden in den von uns hier zitierten Fällen in 360 Tagen pro Hektar den verschiedenartigen Böden durch die Drainwässer (das sind 8,398.080 *l* Wasser) an Phosphorsäureanhydrid entzogen:

Im Falle I = 5·207 *kg*
" " II = 3·527 "
" " III = 5·879 "
" " IV = 8·482 "

Die bedeutendsten Quantitäten an Phosphorsäureanhydrid wurden dem Humusboden von Poděbrad durch die Drainwässer entzogen. Wenn man die Atmungsintensität der Bakterien in diesem Boden beobachtet, so findet man, daß die in 1 *kg* Boden vorhandenen Mikroorganismen in 24 Stunden bei einer Temperatur von 15° C und einem Wassergehalte von 25% nach 20tägiger Beobachtung durchschnittlich 56 *mg* CO_2 ausatmen. Der Humusboden enthält auch die größte Menge Kohlenstoff, und zwar 5·54%. Die Drainwässer des Kalkbodens von Leitomischl und des angeschwemmten Lehmbodens der Urgebirgsformation von Polička weisen fast die gleichen Quantitäten von Phosphorsäureanhydrid auf; der Kohlenstoffgehalt hingegen ist ein verschiedener. Der Kalkboden enthält 0·94%, der Lehmboden 1·71%, also der letztere beinahe eine doppelt so große Menge. Auch die Atmungsintensität der in den betreffenden Böden enthaltenen Bakterien variiert ungemein. Wir fanden, daß von den Bakterien in 1 *kg* Kalkboden in 24 Stunden bei 15° C und einem Wassergehalte von 25% nach 20tägiger Beobachtung durchschnittlich 36 *mg* CO_2 in 1 *kg* Lehmboden unter den gleichen Verhältnissen 24 *mg* CO_2 ausgeatmet werden. Der Tonboden, welchem durch die Drainwässer die kleinste Menge Phosphorsäureanhydrid entzogen wurde, enthielt 1·19% Kohlenstoff, also mehr als der Kalkboden. Die Atmungsintensität der in diesem Boden vorhandenen Bakterien ist jedoch verhältnismäßig eine geringe. Die Mikroorganismen in 1 *kg* des bezüglichen Bodens atmen in 24 Stunden bei einer Temperatur von 15° C und einem Wassergehalte von 25% 15 *mg* CO_2 aus.

Aus diesen Resultaten läßt sich folgern, daß bei der Beurteilung der biologischen Tätigkeit der Mikroorganismen im Boden nicht die Menge der organischen Substanzen (respektive der Kohlenstoffgehalt), sondern die Atmungsintensität der im Boden vertretenen Bakterien maßgebend ist. Die Atmungsintensität beweist, daß im Boden nicht nur eine beträchtliche Menge aktiver Bakterien, sondern auch leicht abbaufähige organische Substanzen vorhanden sind.[1])

---

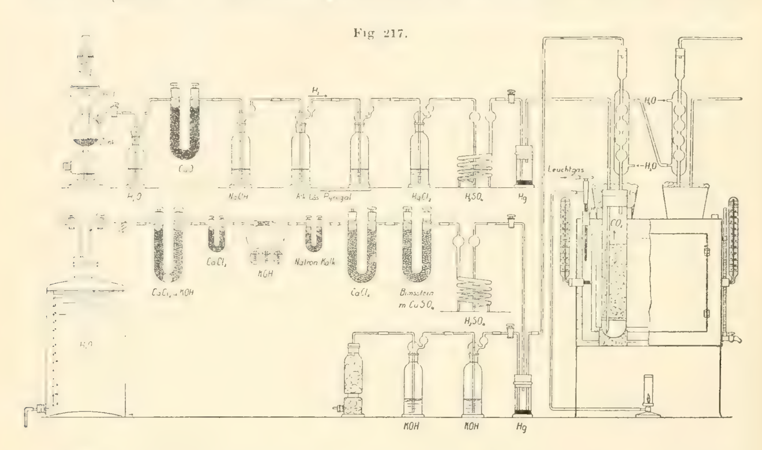
[1]) Ich verweise hier auf meine Arbeit, betitelt „Methoden zur Bestimmung der Exkrete bei der Atmung der Bakterienzelle", *Abderhaldens* Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, 1910.

VII. Methoden zur Bestimmung der Atmungsintensität der Bodenbakterien und der Abbaufähigkeit der organischen Substanzen im Boden nach Julius Stoklasa.

Der Hauptbestandteil des Arrangements der zu diesen Experimenten verwendeten Apparate, das ist der in Form einer großen Eprouvette gewählte Glaszylinder (Versuchszylinder von 40—45 *cm* Höhe und 7 *cm* Lichtöffnung), mit der zu untersuchenden Bodenprobe wird im Thermostaten untergebracht (siehe Fig. 217).

In einer Entfernung von etwa 5 *cm* von dem kugelkappenförmigen Boden des Zylinders wird ein auf einer aus starkem Eisendraht hergestellten, dreifußähnlichen Stütze ruhendes, kleinlöcheriges Sieb aus Eisenblech angebracht. Auf diesem Sieb befindet sich eine 2 *mm* hohe Schichte

Fig. 217.



von Watte. Auf das Sieb mit der Baumwolle werden die dem Atmungsversuch zu unterwerfenden Bodenproben in frischem Zustande in ganzen Stücken ca. 1 *kg* schwer geschüttet.

Man verschafft sich ein gutes Durchschnittsmuster eines Bodens im Gewichte von mindestens 6—8 *kg*, welches gut aufbewahrt wird, um damit mehrere Versuche anstellen zu können. Das Gewicht des zu untersuchenden Bodens wird in der Weise genau festgestellt, daß man zuerst von der Glaseprouvette das Gewicht bestimmt und ca. 1 *kg* frischen Bodens in die Röhre gibt und noch einmal abwiegt. Bevor man in die Röhre den Boden gibt, wird in diesem eine Wasserbestimmung vorgenommen und dann dem Boden im Versuchszylinder so viel Wasser zugesetzt, daß er 20—25% Wasser enthält. Der Eprouvettenmund wird mit einem, zwei Bohrungen tragenden Kautschukpfropfen geschlossen. Durch die eine Bohrung wird ein Glasrohr vom *Liebig*schen Kühler geführt, dessen inneres

Ende knapp unterhalb des Pfropfens mündete. Durch das zweite Bohrloch des Pfropfens geht ebenfalls eine rechtwinkelig gebogene Röhre, welche jedoch durch das Sieb hindurch bis an den Boden des eprouvettenartigen Versuchszylinders reicht. Behufs vollkommen hermetischen Abschlusses des Versuchszylinders nach außen werden der Pfropfen sowie die Bohrlöcher, durch welche das Zu- und Abführrohr gingen, mit Paraffin sorgfältig vergossen.

VIII. Die anaërobe Atmung der Bakterien im Boden.

(Siehe Fig. 217.)

Zu diesen Versuchen wird ein Apparat benutzt, der wie folgt arrangiert ist.

Der dem *Kipp*schen Apparate entströmende Wasserstoff passiert zunächst die mit destilliertem Wasser beschickte Waschflasche H_2O, dann die U-Röhre CuO, welche Kupferoxyd enthält, sodann eine mit konzentrierter Natriumhydroxydlösung gefüllte *Drechsel*sche Waschflasche $NaOH$ und weiter eine ebensolche dritte und vierte, welche eine alkalische Lösung von Pyrogallussäure (5 *g* Pyrogallussäure in 15 cm^3 Wasser und 120 *g* KOH in 80 cm^3 Wasser) enthalten, und schließlich eine fünfte Flasche, welche mit 0·5$^0/_0$iger Sublimatlösung $HgCl_2$ beschickt ist. Das Wasserstoffgas passiert weiter den *Winkler*schen Absorptionsapparat, in welchem sich Schwefelsäure befindet.

Den 40—50 *cm* hohen Zylinder von 7—8 *cm* Durchmesser schließt ein gut dichtender Kautschukpfropfen, der 4 *cm* tief in den Zylinder hineinragt.

Durch den zweimal gebohrten Pfropfen führen zwei Glasröhren, von denen die zuleitende bis nahe an den Boden des Zylinders reicht, während die ableitende des *Liebig*schen Kühlers den unteren Rand des Pfropfens um 5 *cm* überragt. Sie stellen die Verbindung mit zwei kleineren, 11 *cm* hohen Zylindern von 5 *cm* Durchmesser her, die eine 2—4 *cm* hohe Quecksilberschicht enthalten.

In dem kleinen Zylinder, in den die Ableitungsröhre führt, mündet eine kniеartig gebogene, mit einem Ablaßhahn versehene Röhre, die in das Quecksilber eintaucht. Die in Quecksilber tauchenden Röhrenteile sind mit sterilisierter Baumwolle gefüllt. Dasselbe gilt von der in die kleinen Zylinder hineinragenden Mündung des Zuleitungs- und Ableitungsrohres. Das Ableitungsrohr reicht bis in das Quecksilber des zweiten, kleineren Zylinders und ist ebenfalls mit sterilisierter Baumwolle gefüllt.

Außer dem Rohre münden, wie schon erwähnt, noch zwei andere, kniеartig gebogene, mit Hähnen versehene Rohre in diesen Zylinder; das eine verbindet ihn mit dem Absorptionsapparate, während das andere zum Heraustreiben des eventuell noch zurückgebliebenen Kohlendioxyds dient.

Die Gase passieren nach dem Austritt aus dem Zylinder zuerst einen *Winkler*schen Absorptionsapparat (H_2SO_4), der mit konzentrierter

Schwefelsäure gefüllt ist, dann ein 25 *cm* hohes, 2·5 *cm* weites U-Rohr ($CuSO_4$) mit Kupfervitriolbimsstein, ferner ein zweites U-förmiges Rohr ($CaCl_2$), welches Chlorkalzium enthält, das häufig erneuert wird. Das völlig getrocknete Kohlendioxyd passiert zuerst eine U-Röhre, welche mit ausgeglühtem Natronkalk gefüllt ist, sodann den mit Kaliumhydroxyd (Lösung 2:3) gefüllten *Geisslers*chen Apparat. Um die aus diesem entweichende, ganz unbedeutende Menge Wassers und Kohlendioxyds aufzufangen, sind weiter mit festem Kaliumhydroxyd und Kalziumchlorid gefüllte U-Rohre ($CaCl_2 + KOH$) vorgelegt. Weiter rückwärts befindet sich noch ein U-förmiges Schutzrohr, dazu bestimmt, in der Luft enthaltenes Kohlendioxyd (und Feuchtigkeit) zu absorbieren. Es ist mit Kalziumchlorid und Kaliumhydroxyd gefüllt und mit dem Aspirator verbunden. Die Apparate, und zwar die U-Rohre mit Natronkalk, sowie der *Geissler*sche Apparat KOH und die U-Rohre $CaCl_2 + KOH$ werden vor und nach dem Durchleiten der Gase gewogen. Hier ist noch zu bemerken, daß der zur anaëroben Atmung benutzte Wasserstoff oder Stickstoff vor dem Abwiegen der Absorptionsapparate mittelst Durchleitung kohlendioxydfreier Luft entfernt werden muß. Hierzu dient, wie aus der Illustration ersichtlich, ein spezielles Arrangement der Apparate.

Die Zylinder samt den Pfropfen sowie auch ein Teil der Rohre tauchen in einen doppelwandigen kupfernen Thermostaten, der mit zwei Thermometern und einem genauen Thermoregulator sowie auf beiden Seiten mit Glasscheiben versehen ist, um durch letztere die Vorgänge in den Zylindern verfolgen zu können. Die Zylinder samt Pfropfen und zugehörigen Rohren sowie der Kühler werden sterilisiert.

Die Pfropfen der Zylinder werden durch Übergießen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig gemacht. Die oberen Öffnungen des kupfernen Thermostaten werden vollständig mit Watte verstopft, die mit Karbolsäure imprägniert ist.

Der mit Wasser gefüllte Thermostat ist durch Türen verschlossen, so daß der Zutritt von Licht verhindert erscheint. In 24 Stunden werden 20 *l* vom chemisch reinen keimfreien Wasserstoff durch die Zylinder durchgetrieben. Bei dieser Konstruktion der Apparate läßt sich die Temperatur bis auf 40° C steigern.

IX. Die aërobe Atmung der Bakterien im Boden.

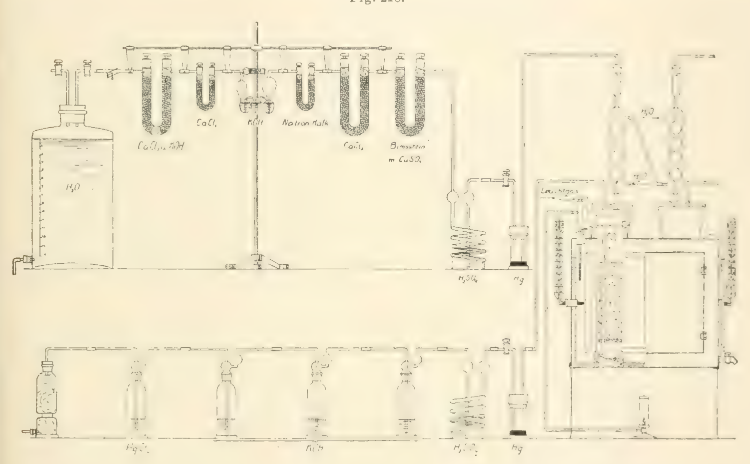
(Siehe Fig. 218.)

Die Anordnung der Versuchsapparate für die aërobe Atmung der Bakterien im Boden wird in derselben Weise durchgeführt, wie das bei der anaëroben Atmung der Fall war, nur mit dem Unterschiede, daß anstatt Wasserstoff kohlendioxyd-, salpetersäure-, ammoniak- und keimfreie Luft in die Atmungsapparate geleitet wurde. Die Luft passiert zuerst einen Zylinder mit sterilisierter Baumwolle, dann die *Drechsel*schen Waschflaschen, von denen die erste mit konzentrierter Sublimatlösung, die

zweite, dritte und vierte mit konzentrierter Kaliumhydroxydlösung und die fünfte mit sterilem destilliertem Wasser beschickt ist.

Nach den *Drechsel*schen Flaschen folgt der *Winkler*sche Absorptionsapparat. Die kohlendioxyd-, salpetersäure-, ammoniak- und keimfreie Luft wird durch kleine Zylinder bis auf den Boden des Atmungsapparates geleitet. Das ausgeatmete Kohlendioxyd geht aus den kleinen Quecksilberzylindern durch den *Liebig*schen Kühler zuerst in einen *Winkler*schen Absorptionsapparat, der mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllt ist, dann in ein 25 *cm* hohes, 2·5 *cm* weites **U**-Rohr mit Kupfervitriolbimsstein, ferner in ein zweites **U**-förmiges Rohr, welches Chlorkalzium enthält, das häufig erneuert wird. Das völlig getrocknete Kohlendioxyd wird von Natronkalk in dem **U**-Rohr

Fig. 218.



und von Kaliumhydroxyd (Lösung 2:3) im *Geißler*schen Apparat absorbiert. Um die aus diesem entweichende, ganz unbedeutende Menge Wasser aufzufangen, sind weiter mit festem Kaliumhydroxyd und Kalziumchlorid gefüllte **U**-Rohre vorgelegt. Weiter rückwärts befinden sich noch zwei **U**-förmige Schutzrohre, dazu bestimmt, in der Luft enthaltenes Kohlendioxyd (und Feuchtigkeit) abzuhalten. Sie sind mit Kalziumchlorid und Kaliumhydroxyd gefüllt und mit dem Aspirator verbunden. Die Absorptionsapparate, und zwar die beiden **U**-Rohre, gefüllt mit Natronkalk und Kalziumchlorid, sowie der *Geißler*sche Apparat wurden vor und nach dem Durchleiten gewogen. Die großen Chlorkalziumrohre, welche sich nach dem Rohr mit Bimsstein befinden, müssen vorher mit Kohlensäure behandelt werden, damit nicht etwa basisches Salz darin ist, welches dann die Kohlensäure aufnimmt (siehe Fig. 218).

Ausführung des Atmungsversuches.

Die aërobe und anaërobe Atmung der Bakterien und Schimmelpilze im Boden muß mindestens 20 Tage verfolgt werden. Täglich werden wenigstens 20 *l* Wasserstoff oder kohlendioxyd-, ammoniak-, salpetersäure- und keimfreie Luft durch den Atmungsapparat bei einer Temperatur von 20—40° C geleitet. Durch diese Prozedur wird festgestellt, wieviel Kohlendioxyd von den in 1 *kg* Boden enthaltenen Mikroorganismen bei konstanter Temperatur und Feuchtigkeitsgrad ausgeatmet wird. Diese ausgeatmete Menge des Kohlendioxyds zeigt uns 1. daß aktive Bakterien im Boden vorhanden sind, und 2. daß wir entweder auf große oder kleine Mengen abbaufähiger Kohlenhydrate im Boden rechnen können.

Um über die Beschaffenheit und Abbaufähigkeit der organischen Substanzen ein genaues Bild zu erhalten, wird der Boden sterilisiert. Zwei Zylinder werden genau mit 1 *kg* Boden gefüllt, dann die Zylinder samt dem Boden bei Dampf im Autoklav gründlich sterilisiert und hierauf bei 80° C getrocknet. Von einem Zylinder wird eine kleine Menge des Bodens herausgenommen und darin der Wassergehalt bestimmt. In dem anderen Zylinder werden 10 *g* frischer Rindviehexkremente mit so viel destilliertem und sterilem Wasser (200—250 cm^3) gemischt, daß die Bodenprobe in dem Atmungszylinder 25% Wasser enthält. Dann werden die Rindviehexkremente mit dem Boden in den Versuchszylindern gut durcheinander gemengt. In einer durchschnittlichen Probe der frischen Rindviehexkremente wird die Kohlendioxydproduktion in 24 Stunden, nach 20tägiger Beobachtung, bei Durchleitung von steriler Luft, und reinen Wasserstoffs festgestellt.

Es werden gewöhnlich pro 10 *g* frischer Rindviehexkremente in 24 Stunden bei 20° C bei Durchleitung von Luft 13—17 *mg* CO_2, bei Durchleitung von Wasserstoff 6—10 *mg* CO_2 produziert.

Bei diesen Versuchen muß man streng beobachten, welche Reaktion der Boden vor dem Versuche hat. Die absorptiv ungesättigten Böden von humidem Gebiete, welche reich an Humus und kolloidalem Ton sind, besitzen gewöhnlich einen sauren Charakter. Bei solchen Böden ist die Atmungspotenz der Mikroorganismen, trotzdem diese Böden in vielen Fällen abbaufähige organische Substanzen enthalten, doch nicht so groß und läßt sich durch Zusatz von Kalziumkarbonat, und zwar 10—25 *g* auf 1 *kg* Boden erhöhen. Die organischen Säuren werden neutralisiert und die Bakterien in ihren Stoffwechselprozessen durch die organischen Säuren nicht beeinträchtigt.

Bei den absorptiv gesättigten, also neutral reagierenden oder alkalischen Böden sind die organischen Substanzen fast immer in einer abbaufähigen Form vorhanden; namentlich bei gut mechanisch bearbeiteten und gut gedüngten Ackerböden arider Gebiete ist dies stets der Fall.

Die Kohlensäure der Bodenluft.

Die Menge der freien Kohlensäure in ein und derselben Bodenparzelle in verschiedenen Tiefen und auf verschiedenen Seiten ist eine ungleiche.

Nach dem gefundenen Quantum freier Kohlensäure in der Bodenluft läßt sich auf den Grad und die Intensität der Fäulnisprozesse in den verschiedenen Bodentiefen schließen. Zur Aspiration der Bodenluft werden enge Bleiröhren benutzt, welche in ein mit dem Erdbohrer gefertigtes Loch bis zur erwünschten Tiefe eingelassen werden. Die Wegnahme der Gasprobe mit den Saugvorrichtungen geschieht nach bekannten Methoden.

Die Bestimmung der Kohlensäure in der Bodenluft erfolgt unter Anwendung von titriertem Barytwasser zur Absorption, Normaloxalsäure zum Rücktitrieren und Phenolphtalein als Indikator. Diese titrimetrische Bestimmung wird mit *W. Hesses* Apparat [1]) vorgenommen.

X. Stickstoffbedarf der Mikroorganismen im Boden.

Ohne Stickstoff können sich die Mikroorganismen im Boden nicht entwickeln. Alle Organismen enthalten Eiweiß, und Eiweiß ist ohne Stickstoff nicht denkbar.

Der Stickstoff kommt im Boden 1. als elementarer Stickstoff, 2. als Stickstoffmonoxyd, 3. in Form von Stickstofftrioxyd, 4. als Stickstoffpentoxyd, 5. in Form von Ammoniak und 6. in Form von stickstoffhaltigen organischen Verbindungen vor.

Im Boden befinden sich die stickstoffhaltigen organischen Verbindungen aus der Gruppe der echten Eiweißkörper, und zwar die Albumine, Globuline und Nukleoalbumine, aus der Gruppe der Proteïde die Nukleoproteïde und Hämoglobine. Ferner sind noch Monoaminosäuren, Diaminosäuren etc. vertreten. [2])

Die mit Fäzes verunreinigten Städteböden, sowie die mit Stallmist reichlich gedüngten Böden enthalten Harnstoff, weiter Abbauprodukte der Purinbasen und zwar Xantin, Hypoxantin, Guanin, Adenin und Harnsäure. Auch Fäulnisprodukte, wie Indol und Skatol, sind in solchen Böden vorhanden.

Der Stickstoff wird von den autotrophen Mikroorganismen in Form von Ammoniak, Stickstofftrioxyd, Stickstoffpentoxyd, Stickstoffmonoxyd und kleinen Mengen stickstoffhaltiger organischer Substanzen (Phosphatiden, Polypeptiden und Aminosäuren) assimiliert.

Die Aufnahme des Stickstoffs durch die Heterotrophen geht bei den Nitrogenorganismen durch den elementaren Stickstoff und Stickstoffmonoxyd aus der Bodenluft, bei den Ammoniakorganismen hauptsächlich durch Ammoniak, bei den Nitratorganismen meistens durch Salpetersäure, bei den Nitritorganismen größtenteils durch die salpetrige Säure vor sich.

Die Peptonorganismen und Eiweißorganismen zersetzen die stickstoffhaltigen organischen Substanzen und es bildet sich als Endprodukt Ammoniak. Als Zwischenprodukte entstehen Glykokoll, Aminovaleriansäure, Leuzin, Prolin,

---

[1]) Siehe *Clemens Winkler*, Lehrbuch der technischen Gasanalyse. Verlag von Arthur Felix, Leipzig 1911.

[2]) *S. L. Jodidi* (Journal Americ. Chem. Soc. 31, 396) gibt die Methode an, die es uns ermöglicht, die Hauptmenge des im Boden vorhandenen Stickstoffs in Form von Diaminosäuren und Monoaminosäuren zu bestimmen. Nach seinen Untersuchungen ist der Stickstoff in den vorerwähnten Formen immer vertreten.

Phenylalanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Tyrosin, Lysin, Arginin, Histidin, Tryptophan, Indol, Skatol, Mono-, Di- und Trimethylamin und Guanidin. In dem Boden werden die stickstoffhaltigen organischen Substanzen in An- und Abwesenheit von Sauerstoff zersetzt. Die Oxydationsvorgänge der stickstoffhaltigen organischen Substanzen werden kurzweg als Oxydationsgärungen bezeichnet. Die tiefe Spaltung der stickstoffhaltigen organischen Substanzen geht bei Sauerstoffabschluß vor sich und es kommen die Fäulnisprozesse zum Vorschein. Die Bestimmung des Grades der Wandlungen der stickstoffhaltigen organischen Substanzen erfolgt entweder bei Sauerstoffzutritt oder Sauerstoffabschluß.

XI. Die Oxydationsvorgänge der stickstoffhaltigen organischen Substanzen im Boden.

Zu diesen Experimenten nimmt man wieder zwei Glaszylinder von 40—45 *cm* Höhe und 7 *cm* im Durchmesser und gibt in jeden davon von einem Durchschnittsmuster 500 *g* eines frischen Bodens, der von Steinen befreit war.

In der Bodenprobe wird die Trockensubstanz und der Gesamtstickstoff nach *Jodlbauer-Kjeldahl* bestimmt. Zu dem Inhalt eines jeden Zylinders wird so viel Wasser zugesetzt, daß die Bodenprobe 30% Wasser enthält. In diesem Wasser befinden sich 10 cm^3 einer gleich stark entwickelten und virulenten Kultur von Bacillus mycoides. Ein Zylinder davon mit dem Boden wird sterilisiert und durch den anderen unsterilisierten werden binnen 24 Stunden 20 *l* kohlendioxyd-, salpetersäure-, ammoniak- und keimfreie Luft geleitet. Die Anordnung der Apparate ist so, wie in Fig. 218 veranschaulicht ist. Der ganze Prozeß verläuft bei 27° C 30 Tage lang. Nach dieser Zeit werden die Zylinder geöffnet, der Inhalt eines jeden einzelnen in einen Zweiliterkolben gegeben, mit destilliertem ammoniakfreiem Wasser verdünnt und gut durcheinander gemischt. In 500—750 cm^3 des klaren Filtrates wird Ammoniak mit gebranntem Magnesiumoxyd abdestilliert. Das entweichende Ammoniak wird in einer Vorlage mit titrierter $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure aufgefangen.

Ich führe hier einige Versuche an, welche mit verschiedenartigen Böden angestellt wurden. Die Versuchsresultate sind auf 1000 *g* Trockensubstanz des Bodens berechnet.

1. Stadtboden von Prag vor der Kanalisation. Gesamtstickstoffgehalt 2·41 *g*. Während des Prozesses, der 30 Tage lang währte, bildeten sich 0·524 *g* Stickstoff in Form von Ammoniak. Die gebildete Menge des Stickstoffs in Form von Ammoniak aus dem Kontrollzylinder betrug 0·098 *g*. Die durch die Tätigkeit der Bakterien aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen gebildete Menge Stickstoffs in Form von Ammoniak beträgt 0·426 *g*. Vom Gesamtstickstoff bildeten sich daher 17·67% Stickstoff in Form von Ammoniak.

2. Waldboden. Gesamtstickstoffgehalt 1·45 *g*. Während des Prozesses, welcher 30 Tage lang dauerte, bildeten sich 0·20 *g* Stickstoff in Form

von Ammoniak. Die gebildete Menge des Stickstoffs in Form von Ammoniak aus dem Kontrollzylinder bezifferte sich auf 0·078 *g*. Die durch die Tätigkeit der Bakterien aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen gebildete Menge Stickstoffs in Form von Ammoniak beläuft sich auf 0·122 *g*. Vom Gesamtstickstoff bildeten sich daher 8·41% Stickstoff in Form von Ammoniak.

3. Ackerboden. Gesamtstickstoffgehalt 1·27 *g*. Während des Prozesses, welcher 30 Tage in Anspruch nahm, bildeten sich 0·153 *g* Stickstoff in Form von Ammoniak. Die gebildete Menge des Stickstoffs in Form von Ammoniak aus dem Kontrollzylinder betrug 0·062 *g*. Die durch die Tätigkeit der Bakterien aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen gebildete Menge Stickstoffs in Form von Ammoniak beläuft sich auf 0·091 *g*. Vom Gesamtstickstoff bildeten sich daher 7·16% Stickstoff in Form von Ammoniak.

Die Ergebnisse dieser Experimente dokumentieren ganz deutlich, daß der chemische Charakter der stickstoffhaltigen organischen Substanzen im Boden nicht immer gleich ist. Die stickstoffhaltigen organischen Substanzen besitzen durch den Einfluß der Bakterien eine verschiedene Abbaufähigkeit, welche durch die Größe der sich bildenden Ammoniakmenge charakterisiert wird. Wir fanden, daß sich beim Stadtboden aus Prag vom Gesamtstickstoff 17·67%, beim Waldboden 8·41% und beim Ackerboden 7·16% Stickstoff in Form von Ammoniak bildeten. Die Oxydation der stickstoffhaltigen organischen Substanzen im Boden (die von *Liebig* als Verwesung bezeichnet wird) ist, vom hygienischen und agronomischen Standpunkte aus betrachtet, von großer Bedeutung. Den Interessenten der Hygiene und Agronomie handelt es sich in erster Reihe um Mineralisierung der stickstoffhaltigen organischen Substanzen im Boden und um Bildung des Ammoniaks, welcher durch die Nitrifikationsbakterien leicht wieder in salpetrige Säure und Salpetersäure umgewandelt wird. Dieser Prozeß verläuft natürlich nur bei genügendem Luftzutritt. Bei Anwesenheit leicht abbaufähiger Kohlenhydrate wird die Salpetersäure zu salpetriger Säure reduziert und durch die Denitrifikationsbakterien in elementaren Stickstoff umgewandelt.

XII. Fäulnis von stickstoffhaltigen organischen Substanzen durch Anaërobier.

Die obligaten oder fakultativen Anaërobier rufen bei Abwesenheit von Sauerstoff Fäulnis der stickstoffhaltigen organischen Substanzen hervor. Es ist ja schon längst bekannt, daß bei Sauerstoffabschluß eine stinkende Fäulnis begünstigt wird, aber eine reichliche Sauerstoffzufuhr sie hindert oder hemmt. Unsere Versuche über das Fäulnisvermögen der stickstoffhaltigen organischen Substanzen im Boden wurden in derselben Weise vorgenommen, wie die früheren, nur mit dem Unterschiede, daß anstatt Luft 20 *l* chemisch reinen Wasserstoffs durch den Versuchszylinder geleitet werden. In dem Durchschnittsmuster eines Bodens, welcher von

Steinen befreit ist, wird der Gesamtstickstoff nach *Jodlbauer-Kjeldahl* und die Trockensubstanz bestimmt. Zu 500 *g* Boden wird so viel Wasser zugesetzt, daß die Bodenprobe 30% Wasser enthält. Der Boden wird dann mit einer stark entwickelten und virulenten Kultur von Bacillus albuminis Schröter geimpft. Dieser Versuch wurde wieder bei 27° C ausgeführt und dauert 30 Tage.

Ich lasse hier die Ergebnisse der von uns mit denselben Bodenarten wie bei den früheren Experimenten, wo Sauerstoff anwesend war, ausgeführten Versuche folgen, die wieder auf 1000 *g* Trockensubstanz des Bodens berechnet sind.

1. Stadtboden von Prag vor der Kanalisation. Gesamtstickstoffgehalt 2·41 *g*. Während des 30 Tage lang dauernden Prozesses bildeten sich 0·74 *g* Stickstoff in Form von Ammoniak. Die gebildete Menge des Stickstoffs in Form von Ammoniak aus dem Kontrollzylinder betrug 0·18 *g*. Die durch die Tätigkeit der Bakterien aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen gebildete Menge Stickstoffs in Form von Ammoniak bezifferte sich auf 0·56 *g*. Vom Gesamtstickstoff bildeten sich daher 23·23% Stickstoff in Form von Ammoniak.

2. Waldboden. Gesamtstickstoffgehalt 1·45 *g*. Innerhalb des Prozesses, welcher 30 Tage lang währte, bildeten sich 0·105 *g* Stickstoff in Form von Ammoniak. Die gebildete Menge des Stickstoffs in Form von Ammoniak aus dem Kontrollzylinder betrug 0·079 *g*. Die durch die Tätigkeit der Bakterien aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen gebildete Menge Stickstoffs in Form von Ammoniak beziffert sich auf 0·026 *g*. Vom Gesamtstickstoff bildeten sich daher 1·79% Stickstoff in Form von Ammoniak.

3. Ackerboden. Gesamtstickstoffgehalt 1·27 *g*. Während des 30 Tage lang währenden Prozesses bildeten sich 0·09 *g*. Die gebildete Menge des Stickstoffs in Form von Ammoniak aus dem Kontrollzylinder belief sich auf 0·07 *g*. Die durch die Tätigkeit der Bakterien aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen gebildete Menge Stickstoffs in Form von Ammoniak beläuft sich auf 0·02 *g*. Vom Gesamtstickstoff bildeten sich daher 1·57% Stickstoff in Form von Ammoniak.

Aus den stickstoffhaltigen organischen Substanzen sind beim Stadtboden aus Prag unter der Einwirkung von Bacillus albuminis bei Sauerstoffabschluß vom Gesamtstickstoff sogar 23·23% Stickstoff in Form von Ammoniak entstanden. Dies beweist, daß bei Sauerstoffabschluß die Fäulnisprozesse stark hervortreten, was jedoch bei dem Wald- und Ackerboden nicht der Fall ist. Wir fanden, daß sich beim Waldboden vom Gesamtstickstoff bloß 1·79% und beim Ackerboden nur 1·57% Stickstoff in Form von Ammoniak gebildet haben.

Diese gefundenen Zahlen bestätigen neuerdings die von uns schon früher vertretene Ansicht, daß die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens, speziell die Luftkapazität und die Abbaufähigkeit der stickstoffhaltigen organischen Substanzen von großer Bedeutung sind.

Wir fanden, daß die stickstoffhaltigen organischen Substanzen in den Städteböden einen ganz anderen chemischen Charakter besitzen, als die stickstoffhaltigen organischen Substanzen im Wald- und Ackerboden. Bei ungenügendem Sauerstoffzutritt entsteht Ammoniumkarbonat, Trimethylamin, Indol, Skatol und aus dem Schwefel der Eiweißkörper Schwefelwasserstoff und Merkaptane. Diese Verbindungen wirken ungemein schädlich auf das Wurzelsystem der Pflanzen, und auf solchen Böden bleiben, unseren Erfahrungen gemäß, die Kulturpflanzen in ihrer Entwicklung zurück.

XIII. Eine biochemische Methode zur Bestimmung des Phosphorsäureanhydrids und Kaliumoxyds, welch beide sich in aufnahmsfähiger Form im Boden vorfinden.

Die chemischen Methoden, welche man bisher zur Feststellung der Menge des seitens des Wurzelsystems der Pflanzen assimilierbaren Phosphorsäureanhydrids und Kaliumoxyds benutzte, lieferten keine verläßlichen Daten. Nach meiner Anschauung eignet sich hierzu am besten die biochemische Methode unter Anwendung von Bakterien, welche elementaren Stickstoff assimilieren. Durch die ausgeschiedenen Sekrete der Bakterien, und zwar durch das Kohlendioxyd und die organischen Säuren werden die wasserunlöslichen Phosphate und Kalisilikate in wasserlösliche Form umgewandelt und die Phosphat- und Kali-Ionen für den Aufbau neuer lebender Materie der Bakterien assimiliert. Wenn man einen Boden mit solchen Bakterien, wie z. B. Azotobacter chroococcum, impft, so vermehren sich die Bakterien in demselben Verhältnis, als sie die einzelnen Ionen in aufnahmsfähiger Form im Boden vorfinden. Selbstredend müssen da für die Entwicklung des Azotobacter alle Vegetationsfaktoren vertreten sein.

A. Bestimmung des Phosphorsäureanhydrids.

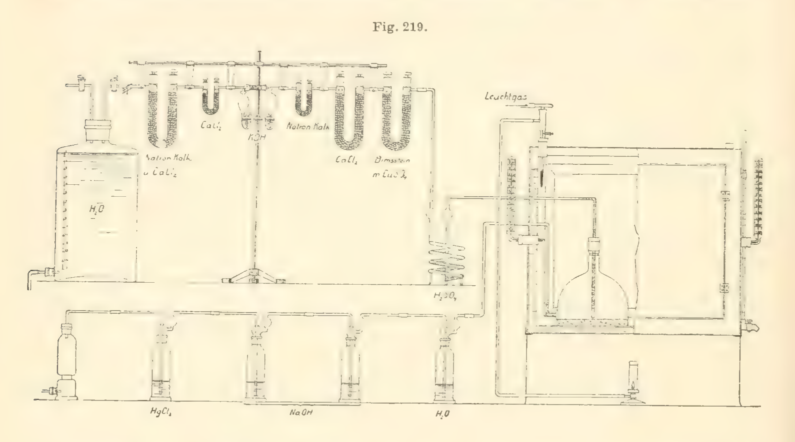
Versuchsmethodik.

Eine Durchschnittsprobe wird auf einer Glasplatte ausgebreitet und hierauf von allen größeren Steinen befreit. Sodann wird in der Bodenprobe das Gesamtphosphorsäureanhydrid und das vorhandene Kalziumkarbonat bestimmt. Man nimmt kleine *Fernbach*sche Kolben (siehe Fig. 219) und gibt in dieselben von einer Durchschnittsprobe 100 *g* verschiedenartiger lufttrockener Ackererde mit 2—6% Wasser herein. Hierauf werden 30 *g* Wasser zugesetzt, in welchem sich 2·5 *g* Glukose, 0·2 *g* Kaliumsulfat und 0·05 *g* Magnesiumchlorid gelöst hatten. Diese 100 *g* Boden samt dem zugesetzten Wasser bilden eine Schichte von 3—4 *mm* Höhe. Die *Fernbach*schen Kolben sind mit einem Kautschukpfropfen verschlossen. Durch den einmal gebohrten Pfropfen führt eine Glasröhre, welche bis nahe an die Oberfläche des Kolbeninhaltes reicht. Die *Fernbach*schen Kolben werden in ein geräumiges Thermostat gestellt und die Temperatur des letzteren auf 20° C konstant erhalten. Der Teil des Apparates, der zur Bestim-

mung des Kohlendioxyds dient, wird neben dem Thermostat auf einem Tisch plaziert. Die Kolben mit der Armatur werden im strömenden Dampf sterilisiert und dann mit Azotobakterkulturen geimpft. Eine Serie der Kolben wird nach der Impfung noch einmal sterilisiert, um die Bakterien zu töten. Die Serie der Kontrollkolben (mit abgetöteten Bakterien) wird in der Brutkammer ebenfalls bei einer Temperatur von 20° C 510 Stunden lang stehen gelassen. Täglich werden 20 *l* keim-, kohlendioxyd-, ammoniak- und salpetersäurefreie Luft durch die Serie der geimpften Kolben oberhalb des Bodens durchgetrieben.

Nach Ablauf von 510 Stunden wird in einer Serie der Kolben der Stickstoff nach *Jodlbauer-Kjeldahl* ermittelt. Die Bestimmung des Stickstoffs in dem Ackerboden ist mit großen Schwierigkeiten verbunden. Wir konnten von den vielen erprobten Methoden nur diejenige benutzen, wo das ganze

Fig. 219.



Quantum, also 100 *g* des Bodens, in 5—6 Aufschließkolben verteilt und dann die Destillation mit Natronlauge portionsweise vorgenommen wurde.

Der Inhalt der anderen *Fernbach*schen Kolben wurde auf 1 *l* der Flüssigkeit verdünnt und in dem reinen Filtrate das Phosphorsäureanhydrid bestimmt.

Die klare Lösung wird mit Salpetersäure angesäuert, bis zur Trockene abgedampft, mit Natriumkarbonat und Natriumnitrat vermischt und sodann verbrannt. Der Rückstand wird in heißem Wasser nach Hinzufügung von Salpetersäure gelöst, filtriert und in dem reinen Filtrate das Phosphorsäureanhydrid mittelst der Molybdänmethode bestimmt. Es ist hier noch hervorzuheben, daß die Filtrate nach dem Versuche nur Spuren von Phosphorsäureanhydrid aufwiesen.

Im nachstehenden sind die weiteren Resultate unserer Untersuchungen wiedergegeben.

1. Granitboden von Svojšic, enthält 0·103% P_2O_5.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·103 *g* P_2O_5.

Die folgenden Daten sind alle auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·164 *g*. Der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben belief sich auf 0·110 *g*. Stickstoffgewinn 0·054 *g*.

Wenn man annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10% Stickstoff enthält, so haben sich 0·54 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Untersuchungen durchschnittlich 5% Phosphorsäureanhydrid. Somit ist in der Bakterienmasse 0·027 *g* Phosphorsäureanhydrid in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt macht dies von der Gesamtphosphorsäureanhydridmenge 26·21.

Demnach wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·027 *g* oder 26·21% P_2O_5 gelöst und von den Bakterien assimiliert.

2. Angeschwemmter Boden von Sadska, enthält 0·084% P_2O_5.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·084 *g* P_2O_5.

Die folgenden Daten sind auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·168 *g*. Der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben bezifferte sich auf 0·086 *g*. Stickstoffgewinn 0·082 *g*.

Wenn man annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10% Stickstoff enthält, so haben sich 0·82 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Untersuchungen durchschnittlich 5% Phosphorsäureanhydrid. Somit ist in der Bakterienmasse 0·041 *g* Phosphorsäureanhydrid in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt, macht dies von der Gesamtphosphorsäureanhydridmenge 48·8.

Demnach wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·041 *g* oder 48·8% P_2O_5 gelöst und von den Bakterien assimiliert.

3. Basaltboden von Tetschen, enthält 0·189% P_2O_5.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·189 *g* P_2O_5.

Die folgenden Daten sind alle auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·178 *g*. Der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben bezifferte sich auf 0·128 *g*, Stickstoffgewinn 0·050 *g*.

Wenn man nun annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10% Stickstoff enthält, so haben sich 0·59 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Untersuchungen durchschnittlich 5% Phosphorsäureanhydrid. Somit ist in

der Bakterienmasse 0·025 *g* Phosphorsäureanhydrid in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt macht dies von der Gesamtphosphorsäureanhydridmenge 13·22.

Demnach wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·025 *g* oder 13·22 % P_2O_5 gelöst und von den Bakterien assimiliert.

4. Waldboden von Kundratitz bei Prag, enthält 0·09 % P_2O_5.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·090 *g* P_2O_5.

Die folgenden Daten sind alle auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·169 *g*.

Der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben bezifferte sich auf 0·148 *g*. Stickstoffgewinn 0·021 *g*.

Wenn man annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10 % Stickstoff enthält, so haben sich 0·21 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Untersuchungen durchschnittlich 5 % Phosphorsäureanhydrid. Somit ist in der Bakterienmasse 0·0105 *g* Phosphorsäureanhydrid in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt macht dies von der Gesamtphosphorsäureanhydridmenge 11·66.

Demnach wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·0105 *g* oder 11·66 % Phosphorsäureanhydrid gelöst und von den Bakterien assimiliert.

B. Bestimmung des Kaliumoxyds.

Um zu eruieren, ob sich Kaliumoxyd im Boden in aufnahmsfähiger Form vorfindet, haben wir zu 100 *g* lufttrockenen Bodens 30 *g* Wasser zugesetzt, in welchem sich 2·5 *g* Glukose, 1 *g* Dinatriumphosphat und 0·05 *g* Magnesiumchlorid gelöst hatten und sind bei den diesbezüglichen folgenden Versuchen sonst genau so vorgegangen wie bei den vorhergegangenen.

1. Granitboden von Svojšic, enthält 0·27 % K_2O.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·27 *g* K_2O.

Die folgenden Daten sind alle auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·169 *g*, der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben belief sich auf 0·110 *g*, Stickstoffgewinn 0·059 *g*.

Wenn man nun annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10 % Stickstoff enthält, so haben sich 0·59 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Erfahrungen durchschnittlich 2·5 % Kaliumoxyd. Somit ist in der Bakterienmasse 0·01475 *g* Kaliumoxyd in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt macht dies von der Gesamtkaliumoxydmenge 5·46.

Demnach wurden vom Gesamtkaliumoxyd von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·01475 *g* oder 5·46% K_2O gelöst und von den Bakterien assimiliert.

2. Angeschwemmter Boden von Sadska, enthält 0·093% K_2O.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·093 *g* K_2O.

Die folgenden Daten sind auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·188 *g*, der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben beziffert sich auf 0·086 *g*. Stickstoffgewinn 0·102 *g*.

Wenn man nun annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10% Stickstoff enthält, so haben sich 1·02 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Erfahrungen durchschnittlich 2·5% Kaliumoxyd. Somit ist in der Bakterienmasse 0·0255 *g* Kaliumoxyd in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt macht dies von der Gesamtkaliumoxydmenge 27·41.

Demnach wurden vom Gesamtkaliumoxyd von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·0255 *g* oder 27·41% K_2O gelöst und von den Bakterien assimiliert.

3. Waldboden von Kundratitz, enthält 0·137% K_2O.

Angewendet wurden 100 *g* mit 0·137 *g* K_2O.

Die folgenden Daten sind auf 100 *g* Trockensubstanz des angewendeten Bodens berechnet.

Der Gesamtstickstoff aus den geimpften Kolben betrug 0·160 *g*, der Gesamtstickstoff aus den ungeimpften Kolben beläuft sich auf 0·148 *g*. Stickstoffgewinn 0·012 *g*.

Wenn man annimmt, daß die Bakterienmasse von Azotobakter in der Trockensubstanz 10% Stickstoff enthält, so haben sich 0·12 *g* der Bakterienmasse gebildet. Diese enthält in der Trockensubstanz nach unseren Erfahrungen durchschnittlich 2·5% Kaliumoxyd. Somit ist in der Bakterienmasse 0·003 *g* Kaliumoxyd in organischen Formen vorhanden. In Prozenten ausgedrückt macht dies von der Gesamtkaliumoxydmenge 2·18.

Demnach wurden vom Gesamtkaliumoxyd von dem Azotobacter chroococcum in 510 Stunden 0·003 *g* oder 2·18% Kaliumoxyd gelöst und von den Bakterien assimiliert.

Nun schreiten wir zur näheren Beobachtung der von uns bei der Phosphorsäureanhydrid- und Kaliumoxydbestimmung erzielten Resultate.

Diese vergleichenden Versuche bezüglich Feststellung des Phosphorsäureanhydrids im Boden ergaben, daß bei dem Granitboden von Svojšic ein Stickstoffgewinn von 54 *mg*, bei dem angeschwemmten Boden von Sadska ein solcher von 82 *mg*, bei dem Basaltboden von Tetschen ein solcher von 50 *mg* und bei dem Waldboden von Kundratitz ein solcher von 21 *mg* zu konstatieren ist. Phosphorsäureanhydrid wurde bei dem Granitboden von Svojšic 27 *mg*, bei dem angeschwemmten

Boden von Sadska 41 *mg*, bei dem Basaltboden von Tetschen 25 *mg* und bei dem Waldboden von Kundratitz 10 *mg* assimiliert.

Bei den Experimenten betreffs der Ermittlung des Kaliumoxyds im Boden wurde bei dem Granitboden von Svojšic ein Stickstoffgewinn von 59 *mg*, bei dem angeschwemmten Boden von Sadska ein solcher von 102 *mg* und bei dem Waldboden von Kundratitz ein solcher von 12 *mg* gefunden. Kaliumoxyd wurde bei dem Granitboden von Svojšic 14 *mg*, bei dem angeschwemmten Boden von Sadska 25 *mg* und bei dem Waldboden von Kundratitz 3 *mg* aufgenommen.

Nach unseren Erfahrungen ist der angeschwemmte Boden von Sadska äußerst fruchtbar. Der Granitboden von Svojšic, sowie Basaltboden von Tetschen waren nur mäßig fruchtbare Böden, der Boden von Kundratitz hingegen ein schlechter Boden, bei welch letzterem durch die Düngung mit wasserlöslicher Phosphorsäure und Kalisalzen ein großer Effekt sowohl in der Quantität als auch in der Qualität der Ernte erzielt wird. Es ist hier noch zu erwähnen, daß der Granitboden von Svojšic, Basaltboden von Tetschen und angeschwemmter Boden von Sadska einen schwach alkalischen Charakter, der Waldboden von Kundratitz hingegen einen schwach sauren Charakter besaß.

Ich könnte aus meiner Praxis noch viele andere Beispiele anführen, durch welche dokumentiert wird, daß die obenerwähnte Methode nur günstige Resultate liefert. Wie wir uns durch zahlreiche Düngungsversuche im Vegetationshaus, sowie am Versuchsfelde überzeugt haben, bietet unsere neue Methode einen Fingerzeig für den Nährstoffersatz unserer Kulturpflanzen auf verschiedenartigen Böden.

XIV. Bakterielle Bodenuntersuchungen.

Nach unseren Untersuchungen existieren folgende Gruppen von Bakterien im Boden, welche den Kreislauf des Stickstoffs in demselben bedingen:

1. Gruppe: Bakterien, welche den Luftstickstoff assimilieren und denselben in organische Formen überführen. Hierher gehören: Bac. radicicola, Clostridium Pastorianum, Bac. megaterium (Alinitbacillus), Azotobacter chroococcum *(Beijerinck)*, Clostridium americanum *(Pringsheim)*[1]), Bac. asterosporus (*Bredemann*)[2]) usw.

2. Gruppe: Bakterien, welche die stickstoffhaltigen organischen Substanzen zersetzen und als Endprodukt Ammoniak bilden. (Bakterien, welche

[1]) *Hans Pringsheim,* Über ein stickstoffassimilierendes Clostridium. Zentralbl. f. Bakt., Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Abt. II. Bd. **16**. 1906. S. 795. — Zweite Mitteilung. Über die Verwendbarkeit verschiedener Energiequellen zur Assimilation des Luftstickstoffs und die Verbreitung stickstoffbindender Bakterien auf der Erde. Ibid. Bd. **20**. 1908. S. 248. Derselbe, Über die Identität stickstoffbindender Clostridien. Ibid. Bd. **24**. 1909. S. 488.

[2]) *Bredemann,* Regeneration der Fähigkeit zur Assimilation von freiem Stickstoff des Bacillus amylobacter. Berichte d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. **26**a. 1908. S. 362.

die stickstoffhaltigen organischen Substanzen mineralisieren.) Hierher gehören: Bac. ureae, Bact. coprophilum, Bact. Severini, Bac. proteus vulgaris, Bac. butyricus *(Hueppe)*, Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bac. mesentericus vulgatus, Bac. foetidus, Bac. tenuis, Bac. megaterium, Bact. coli commune, Bac. typhi abdominalis usw.

3. Gruppe: Nitrosationsbakterien. Diese Gruppe oxydiert Ammoniak zu salpetriger Säure (Nitritation).

4. Gruppe: Nitrifikationsbakterien, welche die salpetrige Säure zu Salpetersäure oxydieren (Nitratation): Bact. nitrobacter usw.

5. Gruppe: Hierher gehören jene Bakterien, welche umgekehrt die Nitrate (Salpetersäure) zu Nitriten (salpetrige Säure) reduzieren und schließlich bis auf die Ammoniakstufe bringen. Es sind dies: Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bact. fuscum, Bac. liquidus, Bac. nubilis, Bac. vulgaris, Bac. coli, Bac. Zenkeri, Bac. prodigiosus, Bac. liquefaciens, Bac. arborescens, Clostridium gelatinosum *(Laxa)* usw.

6. Gruppe: Denitrifikationsbakterien, welche einen großen Teil der Nitrate zu Nitriten und schließlich die salpetrige Säure zu Stickstoffmonoxyd, Stickstoffdioxyd und elementarem Stickstoff reduzieren. In einem bestimmten Nährmedium bewirken sie die Nitratgärung. Wir zählen zu denselben:

Pseudomonas fluorescens (Bac. fluorescens liquefaciens), Pseudomonas Stutzeri (Bac. Stutzeri), Pseudomonas aeruginosa (Bac. pyocyaneus), Bact. Hartlebii, Bact. centropunctatum, Bac. filefaciens, Bact. nitrovorum, Bact. denitrificans usw.

Alle diese Gruppen der Bakterien rufen eine ständige Metamorphose der Stickstoffverbindungen in der Ackerkrume hervor, wenn alle Vegetationsfaktoren vorhanden sind.[1]) Bei dem Bau und Betriebsstoffwechsel bildet sich eine neue lebende Materie, welche auf Kosten des elementaren Stickstoffs, Stickstoffmonoxyds, Stickstoffdioxyds oder des Ammoniaks oder der salpetrigen Säure oder der Salpetersäure in Gegenwart geeigneter Kohlenhydrate oder organischer Säuren (in Form von neutralen Salzen) sowie bei Vorhandensein aller wichtigen anorganischen Nährstoffe, und zwar des Phosphors, Schwefels, Chlors, Kaliums, Natriums, Magnesiums, Kalziums, Aluminiums, Eisens und Mangans entsteht. Durch die Tätigkeit der lebenden Bakterienzellen geht hauptsächlich eine Synthese der formativen und plastischen Stickstoffverbindungen vor sich. Die Synthese der formativen und plastischen Stickstoffverbindungen ist in erster Hinsicht von dem Wachstum der Bakterien und der damit in Verbindung stehenden Energie der Assimilation des elementaren Stickstoffs (bei den Bakterien, welche elementaren Stickstoff assimilieren), ferner von der Intensität des Ammonisationsprozesses oder von der Energie der Nitrit- sowie Nitratbildung und Nitratgärung abhängig. Mit der Energie des Stoff- und Gasaustausches wächst auch die Bildung der formativen und plastischen Stickstoffverbindungen. Alle diese Prozesse sind abhängig: 1. Von dem Verhältnisse der Menge des Energiematerials

[1]) *Orla Jensen*, Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Zentralbl. f. Bakt., Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Abt. II. Bd. 22. 1909.

zur Menge des Stickstoffes im Nährmedium; 2. von der Mechanik der physiologischen Verbrennung; 3. von der Konzentration der Lösung; 4. von der Temperatur und 5. von der Gegenwart oder Abwesenheit des Sauerstoffs. d. h. inwiefern der Prozeß ein aërobiotischer oder ein anaërobiotischer ist.

Zu den wichtigen Vegetationsfaktoren der Bakterien sind die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Bodens zu zählen. Erst durch einen günstigen physikalischen Bau und durch eine günstige Bodenlagerung kommen die biochemischen Vorgänge der Bakterien zur vollen Geltung. Namentlich sind das die physikalischen Eigenschaften, wie Durchlässigkeit, Wasser- und Luftkapazität, Porosität des Bodens, welche auf die Anreicherung des Stickstoffs des Bodens durch die Bakterien und auf die Metamorphose der stickstoffhaltigen Substanzen den größten Einfluß ausüben.

Je mehr Energiequelle im Nährmedium vorhanden ist, desto mehr formative und plastische Stickstoffverbindungen werden bei Gegenwart von geeigneten Stickstoffquellen, ferner des PO_4-Ions und noch anderer anorganischer Nährstoffe gebildet.

Einen großen Einfluß auf alle diese Prozesse hat die Wahl der Kohlenstoffnährquelle und zwar der Kohlenhydrate oder der organischen Säuren in neutraler Form, denn die Bakterien sind in bezug auf die Konfiguration des Moleküls der Kohlenhydrate sehr wählerisch. Es müssen die Experimente mit Bakterien derart ausgeführt werden, daß im Nährmedium den Bakterien immer die beste Kohlenstoffnährquelle geboten wird, um ein möglichst starkes Wachstum der Bakterien zu erzielen. Die quantitative Bestimmung der bakteriellen Tätigkeit des Erdbodens ist zuerst von *T. Remy* bearbeitet worden. Es dienten ihm dazu die Methoden zur Bestimmung der stickstoffbindenden Kraft des Bodens des Fäulnisvermögens, der nitrit- und nitratbildenden Fähigkeit und der denitrifizierenden Kraft des Bodens.

Remy publizierte die Ergebnisse dieser bakteriologischen Studien [1]) im Jahre 1902 und versuchte die systematische Nutzbarmachung von Anhäufungskulturen für biologische Bodenuntersuchungen. Doch war ihm, im Gegensatz zu den früheren Bestrebungen ähnlicher Art, nicht der Umfang der Entwicklung bestimmter Organismen in den gewählten Nährflüssigkeiten, sondern die Ausgiebigkeit leicht feststellbarer, stofflicher Veränderungen in diesen der Anhaltspunkt für die Beurteilung der Bakterienkräfte im Boden. [2])

[1]) *Th. Remy*, Bodenbakteriologische Studien. Zentralbl. f. Bakteriol. Bd. 8. 1902. Nr. 21. S. 657, 699, 728 und 761.

[2]) Über die Methode von *Remy* äußerte sich *Hugo Fischer* in seiner Abhandlung: „Einige neuere Erfahrungen der Bodenbakteriologie" (Berichte der deutschen botan. Gesellschaft, 28. Jahrg., Berlin 1910) in folgender Weise: „Einen wirklichen Anhalt für Beurteilung des bestehenden bakteriellen Bodenzustandes bekommen wir also nach der Methode *Remy-Löhnis* nur für die Nitrobakterien und zum Teil vielleicht auch für die Stickstoffsammler, sicherlich nicht für die ammonisierenden und für die denitrifizierenden Bakterien. Dagegen können wir aus geringer bakterieller Aktivität mit bedeutender Sicherheit darauf schließen, daß es dem betreffenden Boden entweder an Kalk oder an Humus oder vielleicht an noch etwas anderem unbekanntem mangelt."

Die Methode von *Remy* wurde von vielen Forschern ergänzt, namentlich von *Hiltner, Ehrenberg, Wohltmann, Fischer, Schneider, Vogel, Löhnis, Buhlert, Fickendey, Stoklasa* und *Chr. Barthel.*

Probenahme.

Die Probenahme wird nach *Vogel* und *Zeller*[1]) folgendermaßen vorgenommen: von = 1 *ha* Boden wird von 500 verschiedenen Stellen nach jedesmaliger Entfernung der obersten Bodenschicht mit einem mit Alkohol gereinigten und abgeflammten Spaten die zur Untersuchung bestimmte Probe von der darunter liegenden Erde aus etwa 8—15 *cm* Tiefe entnommen. Es kommen also stets nur die oberen Schichten der Ackerkrume, in welchen sich das Bakterienleben am lebhaftesten vollzieht, zur weiteren Prüfung. Die erhaltenen Einzelportionen gelangen in saubere, trockene, mehrere Stunden auf 90—100° C erhitzt gewesene, mit Glasstöpsel verschlossene Glasbüchsen und werden im Laboratorium auf einer sterilen Glasplatte mit sterilisierten Löffeln gründlich durchgemischt. Alsdann werden die Proben durch ein längere Zeit auf 150° C erhitzt gewesenes 3 *mm*-Sieb gesiebt und der nochmals durchgemischte Boden zu den Untersuchungen verwendet. Von der gesiebten und gründlich durchgemischten Erde wird stets sofort der Gesamtstickstoff- und Wassergehalt bestimmt und ein wässeriger Auszug auf Anwesenheit von Nitrat, Nitrit und Ammoniak geprüft. Sind Salpetersäure oder salpetrige Säure nachweisbar, so erfolgt die Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach *Jodlbaur*, andernfalls ohneweiters nach *Kjeldahl.* Bei Anwesenheit größerer Mengen von Salpetersäure, salpetriger Säure und Ammoniak ist es unumgänglich notwendig, alle 3 Stickstofformen zu bestimmen. Die Wasserbestimmungen werden stets doppelt unter Anwendung von 50 *g* Erde, die Stickstoffbestimmungen vierfach unter Benützung von 25 *g* Erde ausgeführt.

a) Assimilation des elementaren Stickstoffes durch im Boden vorhandene Bakterien.

Um Aufschluß über die biologische Leistungsfähigkeit der Mikroben zu erlangen, bedient man sich folgender Nährlösung: In 1000 cm^3 destillierten Wassers werden gelöst:

20 *g*	Mannit,	0·2 *g*	Natriumchlorid,
1 *g*	Dikaliumphosphat,	je 0·1 *g*	Eisensulfat und Aluminiumsulfat,
0·2 *g*	Magnesiumchlorid,		
0·5 *g*	Kalziumkarbonat,	0·01 *g*	Manganchlorid.

Wir benutzten hierzu genau denselben Apparat, wie wir ihn für die aërobe Atmung[2]) verwendeten. Es war dies ein nach unseren Angaben

[1]) *Vogel* und *Zeller*, Beiträge zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchungen. Mitteilungen des Kaiser Wilhelm-Instituts für Landwirtschaft in Bromberg Bd. 1. Heft 2.

[2]) *Julius Stoklasa*, Methoden zur Bestimmung der Exkrete bei der Atmung der Bakterienzelle. *E. Abderhaldens* Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. 1910. S. 533.

speziell konstruierter Kolben, in welchem 1 *l* Nährlösung in ganz dünnen Schichten in Anwendung gebracht werden konnte. Der Kolben hatte im Boden einen Durchmesser von 40 *cm*.

Jeder Kolben enthielt 1000 cm^3 der Nährlösung, die am Boden des Kolbens eine sehr dünne Schicht bildete. Nach gründlicher Sterilisation der Kolben samt Pfropfen in strömendem Dampf wurde am 6. Tage die Lösung mit 25 *g* Erde versetzt. Hierauf wurden die Kolben in einen Thermostaten gestellt und dessen Temperatur auf 20° C konstant erhalten. Daselbst wurden sie 30 Tage belassen. Einige Kolben mit Nährlösung und Boden wurden noch einmal sterilisiert und dienten als Kontrollkolben. Nach diesen 30 Tagen wurde der Inhalt der einzelnen Kontrollkolben mit destilliertem Wasser auf 2000 cm^3 der Lösung verdünnt, der ganze Inhalt der 2 *l*-Kolben auf 5 Teile verteilt und der Stickstoff nach *Kjeldahl-Wilfarth* bestimmt. In derselben Weise wurde auch der Stickstoff in den blinden Kolben ermittelt. Der Stickstoffgewinn in Milligramm pro Liter der Nährlösung, respektive pro 25 *g* Boden wird auf die Art festgestellt, daß man von dem Gesamtstickstoff der Kolben mit unsterilisiertem Boden den Stickstoffgehalt der blinden Kolben abzieht.

b) Methode zur Bestimmung des Ammonisationsvermögens[1]) der Böden.

Zunächst benutzte *Remy*[2]) zur Bestimmung der Ammonisationskraft des Bodens Lösungen von 1% *Schering*schem Pepton in Leitungswasser. Die zu je 100 cm^3 in kleine *Erlenmayer*sche Kölbchen gebrachte Nährlösung wurde nach fraktionierter dreimaliger Sterilisation unter tunlichstem Infektionsschutz mit 10%, also pro Kölbchen mit 10 *g* der zu untersuchenden rohen Erde geimpft. Die Lösungen standen bei 20° C im Thermostaten. In bestimmten Zeitabständen, und zwar meist nach 4×24 und 8×24 Stunden wurde durch Kochen mit gebrannter Magnesia der abgebaute Stickstoff in einem Teil der Lösung bestimmt.

Die Bildung des Ammoniaks aus Pepton ist die letzte Phase des Abbauprozesses, an dem sich nach- und nebeneinander mancherlei Organismen beteiligen und der auch ganz verschiedenartige Spaltungsvorgänge umfaßt.

Als leichtabbaufähige Stoffe hat später *Remy* besonders empfohlen: 1. Pepton *Witte* in 0·8%iger Lösung zu je 100 cm^3 dosiert. 2. Pepton *Merk* in 1%iger Lösung zu je 100 cm^3 dosiert. 3. Feingemahlenes und durch zweimaliges, je einstündiges Erhitzen auf 100° C sterilisiertes Bluteiweiß zu je 1 *g* mit 20 cm^3 sterilem Leitungswasser aufgeschwemmt. 4. Getrocknete, feingemahlene und in der unter 3. erwähnten Weise vorbereitete Hornspähne, zu je 0·75 *g* mit 20 cm^3 sterilem Leitungswasser aufgeschwemmt. 5. Feinste Gelatine in 0·8%iger, mit Soda neutralisierter Lösung zu je 100 cm^3 dosiert.

[1]) Die Bakteriologen nennen dieses Vermögen gewöhnlich Fäulnisvermögen, doch ist diese Bezeichnung wenig passend, weil ja die betreffenden Vorgänge bei Sauerstoffzutritt stattfinden.

[2]) *Th. Remy* und *G. Rösing*, Beitrag zur Methodik der bakteriellen Bodenuntersuchung. (Zentralblatt für Bakteriologie etc. 1910. Bd. 29. Nr. 1/3. S. 36.)

Die genannten stickstoffhaltigen Substanzen wurden in kleine Erlenmeyerkölbchen gebracht und dann im strömenden Dampf fraktioniert sterilisiert. Geimpft wurde pro Kölbchen mit 10 *g* der zu untersuchenden Bodenprobe.

Des weiteren führe ich hier das Verfahren an, welches *Chr. Barthel*[1]) zur Bestimmung des Ammonisationsvermögens der Böden empfohlen hat.

Bei diesen Versuchen hinsichtlich des Ammonisationsvermögens des Bodens wurde $1^1/_2$%ige Peptonlösung (Pepton *Witte*) angewandt. Probierröhren, welche 10 *cm*³ dieser Lösung enthielten, wurden mit 5 *cm*³ einer Bodenaufschlemmung geimpft, die in der Weise hergestellt war, daß man nach *Buhlert* und *Fickendey*[2]) 300 *g* des untersuchten Bodens mit 300 *cm*³ sterilen Wassers schüttelte. Die vergleichenden Versuche mit dieser Aufschlemmungsmethode einerseits und der *Remy*schen Methode mit Abwägen des Bodens andrerseits ergaben als Resultat eine bessere Übereinstimmung unter den Parallelversuchen im erstern Falle. Dies zeigte sich nicht nur hinsichtlich der Bestimmung des Ammonisationsvermögens, sondern auch in bezug auf das Denitrifikations- und das Stickstoffassimilationsvermögen. Nach 4 Tagen wurde das bei 20° C gebildete Ammoniak mit Magnesia abdestilliert und auf gewöhnliche Weise bestimmt. Es wurden jedesmal 3 Parallelversuche angestellt, außerdem destillierte man ein ebensolches Rohr unmittelbar nach dem Zusatz der Bodenaufschlemmung ab, um den schon von Anfang an vorhandenen Ammoniakstickstoff zu bestimmen, welcher dann von den erhaltenen Resultaten abgezogen wird. Es zeigte sich bald, daß die bei der Bestimmung des Ammoniakstickstoffs in den verschiedenen Parallelversuchen erhaltenen Zahlen recht gut miteinander übereinstimmten. Ebenso erwies es sich, daß verschiedene Böden sehr große Schwankungen im Peptonspaltungsvermögen aufweisen. Tatsächlich geben auch verschiedene Böden charakteristische Unterschiede; aber eine wirkliche, zu weiteren Schlüssen berechtigende Übereinstimmung wurde bisher nach *Hugo Fischer* nicht erzielt, auch nicht, nachdem *Löhnis* die Verbesserung eingeführt hatte, an Stelle von Wasser zum Ansetzen der Nährlösungen einen im Autoklaven hergestellten Auszug des zu untersuchenden Bodens zu verwenden.

Es sind hier noch einige Methoden zu erwähnen, welche zur Ermierung dienen, ob im Boden Bakterien vorhanden sind, welche den Harnstoff und das Calciumcyanamid leicht zersetzen. Bei den Untersuchungen bezüglich Harnstoffzersetzung durch Bodenbakterien erhielt *Söhngen* besonders gute Resultate, wenn er die Harnstoffammonmalatlösung mit (2%) Erde impfte und bei 33° C kultivierte. Es kamen fast nur Harnstoffzersetzer zur Entwicklung (spez. Urobacillus Leubei, Maddoxii, Freudenreichii, Duclauxii, Jakschii). Sehr brauchbar erwies sich auch Bodenextrakt + 0·05% K_2HPO_4 + 5% (oder weniger) Harnstoff.

---

[1]) *Chr. Barthel*, Bodenbakteriologische Untersuchungen. Zentralblatt für Bakteriologie etc. 1910. Bd. 25. S. 108.

[2]) *Buhlert* und *Fickendey*, Zur Methodik der bakteriologischen Bodenuntersuchung. Zentralblatt für Bakteriologie etc. 1906. Bd. 16. S. 399.

Die Calciumcyanamidzersetzung erfolgt in Lösungen (Leitungswasser oder Erdextrakt + 2‰ Kalkstickstoff + 0·5‰ K_2HPO_4 + 0·1‰ Asparagin + 0·1‰ Traubenzucker) nur dann ungestört, wenn ausreichende Erdmengen zugegen sind. Vorheriges gelindes Erhitzen der Flüssigkeit ist auf den Effekt ohne Einfluß. Zur Isolierung dient eine entsprechende, deutlich alkalisch reagierende Gelatine. Die Reinkulturen können entweder in der durch mehrmaliges Erhitzen im strömenden Dampf sterilisierten oder durch Porzellan filtrierten Lösung geprüft werden; im letzteren Falle müssen jedoch absorbierende Substanzen und CO_2 steril zugegeben werden. Die von *Kappen* gegen die Tauglichkeit der im Dampf sterilisierten Kalkstickstofflösung erhobenen Einwände waren unbegründet.

Ich verweise hier auf die ausführliche und interessante Arbeit von *F. Löhnis* und seiner Mitarbeiter, siehe Landwirtschaftliche Bakteriologie von Dr. *F. Löhnis.* Verlag von Gebrüder Bornträger, Berlin 1910.

c) Methode zur Bestimmung des Nitrifikationsvermögens der Böden.

Bei diesen Versuchen wurde von *Buhlert* und *Fickendey* ausschließlich folgende Lösung angewandt:

25 *cm*³ Leitungswasser,
0·1 *g* Ammoniumsulfat,
0·05 *g* Kaliumphosphat,
1 *g* basisches Magnesiumkarbonat.

Diese Lösung wurde mit 20 *cm*³ Bodenaufschlemmung geimpft und nach 40 Tagen bei Zimmertemperatur der Salpetergehalt der Lösung nach der Methode von *Schlösing* bestimmt.

Zur Konstatierung des Salpetersäureanhydrids kann man auch die Methode von *Reitmair, Grandval* und *Lajoux* mit Vorteil benutzen. Bei Behandlung von Nitraten mit Phenolschwefelsäure im Überschuß bildet sich Pikrinsäure, welche bei Zusatz von Wasser und Ammoniak ein sehr stark gelb gefärbtes Ammoniumsalz ergibt. Nitrite liefert diese Reaktion nicht. Der Bodenextrakt wird mit einer empirisch festgestellten Skala verglichen. Es handelt sich hier also um eine kolorimetrische Methode. Die Skala wird in der Weise festgestellt, daß 7·22 *g* Kaliumnitrat in 1 *l* destilliertem Wasser gelöst werden (Lösung 1). Hiervon werden 50 *cm*³ abpipettiert und auf 1 *l* verdünnt (Lösung 2); hiervon werden nunmehr 100 *cm*³ abgehoben, worauf man auf 1 *l* verdünnt (Lösung 3).

1 *cm*³ von Lösung 3 entspricht 0·005 *mg* Stickstoff. Von dieser Lösung werden 1 *cm*³ (= 0·0050 *mg* Stickstoff), 1·5 *cm*³ (= 0·0075), 2 *cm*³ (= 0·0100), 2·5 *cm*³ (= 0·0125), 3 *cm*³ (= 0·0150), 4 *cm*³ (= 0·0200), 5 *cm*³ (= 0·0250), 6 *cm*³ (= 0·0300) und 8 *cm*³ (= 0·0400 *mg* Stickstoff) in Glasschalen auf dem Wasserbade bis zur Trockne abgedampft. Hierauf wird überall 1 *cm*³ Phenolschwefelsäure (100 *g* kristallisiertes Phenol in 900 *g* Schwefelsäure) zugesetzt und mit derselben durch Drehen und Wenden der Schale der trockne Rückstand vollständig befeuchtet. Hierauf wird mit 5 *cm*³ Wasser

verdünnt und 15 cm^3 5 %iges Ammoniak zugesetzt. Nun tritt die gelbe Farbe auf. Der Inhalt der Schalen wird in Kolorimeterzylinder von 50 cm^3 übergespült und das Volumen bis zur Marke aufgefüllt. Ein gleicher Zylinder mit destilliertem Wasser vervollständigt die Skala.

Zur Bestimmung von Salpetersäureanhydrid in einer Bodenprobe läßt man 100 *g* Boden unter oft wiederholtem Schütteln 1 Stunde mit 200 cm^3 destilliertem Wasser stehen. Sodann filtriert man und dampft von dem Filtrat 50 cm^3 in einer Glasschale bis zur Trockne auf dem Wasserbade ein. Die weitere Behandlung ist dieselbe wie hier oben beschrieben. Schließlich füllt man einen kolorimetrischen Zylinder von 50 cm^3, worauf man mit der vorhin aufgestellten Skala vergleicht.

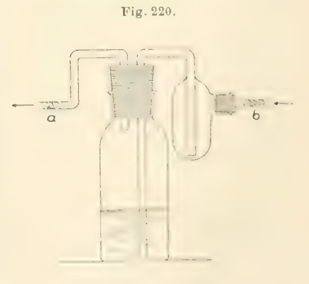
Um das meistens trübe Filtrat des Bodens zu klären, wird das Filtrat in einem Becher mit einigen Kubikzentimetern Kalkwasser (100 *g* CaO + 1000 cm^3 H_2O) versetzt, auf dem Wasserbade erwärmt, sodann in eine Glasschale filtriert und gewaschen.

Anstatt eine solche vollständige Skala anzuwenden, ist es viel bequemer, nach *Söderbaums* Vorschlag nur 2 oder 3 Lösungen, z. B. zu 5, 10 und 20 cm^3 von Lösung 3 zu benutzen. Die zu untersuchende Lösung wird (jedesmal 5 cm^3 auf 50 cm^3) verdünnt, so daß sie in der Farbe schwächer wird als irgend eine der Standardlösungen. Alsdann wird die Farbstärke und damit der Gehalt der Lösung mit Hilfe eines Kolorimeters, z. B. desjenigen *Gallenkamps*, bestimmt.

Diese Methode zur Bestimmung des Salpetersäureanhydrids läßt sich äußerst leicht ausführen und ist daher ganz besonders geeignet, wenn man eine große Anzahl Proben gleichzeitig zu analysieren hat; außerdem ist sie besonders scharf und empfindlich.

Boullanger und *Massol*[1]) haben für die Messung des Nitrifikationsvermögens der Böden einen eigenen Apparat konstruiert. Dieser besteht aus einem Kolben (siehe Fig. 220) von 100 cm^3 Rauminhalt, in welchen ein Kautschukstöpsel eingefügt wird, der mit zwei Löchern versehen ist. Durch das eine wird eine einfache, winkelrecht gebogene Glasröhre eingesetzt, während in dem anderen eine Röhre angebracht wird, die bis auf den Boden des Kolbens hinabreicht. Oberhalb des Stöpsels ist auch diese Röhre im Winkel gebogen; außerdem war das freie Ende noch einmal, und zwar abwärts gebogen und mit einem Apparat von der Gestalt versehen, wie es Fig. 220 zeigt.

Fig. 220.



Vor Anwendung des Apparates wird die Nitrifikationslösung eingefüllt; bei *a* und *b* werden Wattepfropfen eingesetzt; sodann wird der

[1]) *Boullanger* und *Massol*, Ann. de l'Inst. *Pasteur*. 17. 1903 u. 18. 1904.

ganze Apparat im Autoklav sterilisiert. Man muß hierbei die längere Röhre etwas hoch stellen, so daß ihre Mündung sich oberhalb des Niveaus der Flüssigkeit befindet, weil die Lösung sonst leicht in den Apparat bei *b* hinaufgepreßt und von da durch die Watte hinausgedrängt wird. Nach Abkühlen wird die Lösung mit der Bodenaufschlemmung geimpft, worauf man den Apparat bei *a* mit einem Aspirator in Verbindung setzt. Der kleine Apparat bei *b* dient nur dazu, zu verhindern, daß die Flüssigkeit durch den Wattepfropfen hinausdringt, sobald einigermaßen ein Gegendruck entsteht, was leicht eintreten kann, wenn die Luftsaugung Tag und Nacht in Gang gehalten werden soll. Entsteht dieser Gegendruck, so wird ein kleiner Teil der Flüssigkeit in den kleinen Behälter übergeführt; bei erneutem Saugen jedoch geht diese Quantität wieder in den Kolben zurück. Natürlich läßt sich eine ganze Reihe solcher Apparate miteinander verbinden und durch eine Öffnung in der Wand des Thermostaten wird die Leitung zum Aspirator geführt. Am Ende der Reihe wird eine gewöhnliche Waschflasche mit Wasser eingeschaltet, so daß die Luft, die durch die Flasche gesogen wird, sich beständig feucht hält. Auf diese Weise wird verhindert, daß die Flüssigkeit in den Flaschen verdunstet. Der durchgesogene Luftstrom muß sehr kräftig sein, so daß die Bodenpartikelchen zum größten Teil sich schwebend in der Lösung halten.

d) Methode zur Bestimmung des Denitrifikationsvermögens der Böden.

Denitrifikationsprozesse finden in einem Boden nur dann statt, wenn er leicht abbaufähige organische Substanzen enthält und bei ungenügendem Sauerstoffzutritt.

Um zu ermitteln, ob tatsächlich Denitrifikationsorganismen im Boden vorhanden sind, verwendet man nachstehende Lösung. In 1 *l* destillierten Wassers werden gelöst:

20 *g*	Glukose,
5 *g*	Kalziumnitrat,
1 *g*	Dikaliumphosphat,
0·1 *g*	Magnesiumchlorid,
0·1 *g*	Eisensulfat,
0·1 *g*	Aluminiumsulfat,
0·01 *g*	Manganchlorid und
0·1 *g*	Natriumkarbonat.

Man benutzt eine größere Eprouvette mit 50 cm^3 dieser sterilisierten Lösung, impft letztere mit 25 cm^3 Bodenaufschlemmung und läßt die Eprouvette in einem Thermostaten bei 25—30° C. Bei Vorhandensein einer gewissen Menge von Denitrifikationsmikroben im Boden tritt schon nach 24 Stunden eine Nitratgärung ein.

Mit Hilfe von Diphenylamin und Schwefelsäure kann man sich überzeugen, wie die Salpetersäure nach und nach aus der Lösung verschwindet.

Die quantitative Bestimmung des Salpetersäureverlustes wird in nachstehender Weise vorgenommen: Es werden *Erlenmeyer*sche Kolben, welche 2500 *cm*³ fassen, mit 500 *cm*³ der beschriebenen Nährlösung angefüllt. Nach gründlicher Sterilisation und nach Ablauf des Inkubationsstadiums werden die Kolben mit 50—100 *cm*³ Bodenaufschlemmung geimpft. Einige Kolben bleiben nach nochmaliger Sterilisation als Kontrollkolben, die anderen werden 10—30 Tage in der Brutkammer bei einer Temperatur von 25—30° C belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Stickstoff sowohl der blinden als auch der anderen Kolben, in denen keine Nitratgärung vor sich ging, in folgenden Formen bestimmt:

a) als Ammoniak,

b) als salpetrige und Salpetersäure und

c) in organischer Form.

Bei der Analyse wird nach *Stoklasa* in nachstehender Weise vorgegangen [1]):

Der Inhalt des Kolbens wird nach dem Versuche auf 2000 *cm*³ verdünnt. Von dieser 2000 *cm*³ betragenden Flüssigkeit werden 500 *cm*³ zur Bestimmung des Ammoniaks abgemessen, und zwar erfolgt dies entweder durch Destillation mit Mg O oder nach der Methode *Baumann-Böhmer* in der Weise, daß eine Portion von 500 *cm*³ der vorerwähnten verdünnten Flüssigkeit sehr schwach mit Phosphorsäure angesäuert, im Wasserbade bis auf einen kleinen Rest eingedampft und dieser in ein Becherglas abgespült wird, so daß derselbe etwa 100 *cm*³ beträgt. Aus dieser Lösung werden die vorhandenen Eiweißkörper nach der Methode *Stutzers* gefällt, d. h. sie werden bis zum Sieden erhitzt, dann ihnen etwa 3 *cm*³ Alaun hinzugefügt und nach teilweiser Abkühlung 5 *cm*³ Kupferoxydhydrat (enthaltend 0·3—0·4 *g* $Cu(OH)_2$) zugegossen. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit Wasser durchgewaschen. Das Filtrat, welches eine schwach saure Reaktion zeigt, wird neuerdings bis auf 50 *cm*³ abgedampft und demselben 50 *cm*³ Schwefelsäure (1 : 1) und 80 *cm*³ phosphorwolframsaures Natron (200 *g* Natriumwolframat und 120 *g* Natronphosphat gelöst in 1000 *cm*³ Wasser) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird auf 60° erwärmt und auf die Dauer von 48 bis 72 Stunden unter eine Glasglocke gestellt. Der sich bildende Niederschlag wird auf dem Filter aufgefangen, nach erfolgtem Waschen mit verdünnter Schwefelsäure (Verdünnungsverhältnis 1 : 2) samt dem Filter in einen Destillationskolben gebracht und mit Magnesia (Mg O) abdestilliert.

In einem Quantum von 500 *cm*³ der Lösung, welche zur Feststellung der salpetrigen und Salpetersäure bestimmt waren, wird vorerst ebenfalls das Ammoniak mittelst Destillation mit Natronlauge festgestellt. Allerdings liefert die Destillationsmethode mittelst Natronlauge etwas höhere Daten, weil durch diese Destillation teilweise die in der Lösung vor-

[1]) *Julius Stoklasa* und *Eugen Vitek*, Über den Einfluß der Bakterien auf die Metamorphose der Salpetersäure im Boden. Zeitschrift für das landwirtschaftliche Versuchswesen in Österreich. 1906.

handenen stickstoffhaltigen Substanzen gespalten werden. Die Differenz zwischen dem Stickstoff, welcher in Form von Ammoniak durch Destillation mit Magnesia und jenem, der durch Destillation mit Natronlauge gefunden wurde, ist dem organischen Stickstoffgehalte zugezählt worden.

Die Salpetersäure wird in dieser Flüssigkeit nach der Abdestillation des Ammoniaks mittelst Natronlauge nach der Methode *Dewarda* bestimmt. Zu dem entsprechend abdestillierten Reste werden etwa 5 cm^3 Alkohol und 2·5 *g Dewarda*scher Mischung hinzugefügt und nach beendigter Reduktion das aus der Salpetersäure entstandene Ammoniak ausgetrieben. In der Lösung wird schließlich nach der Bestimmung des Ammoniaks und der Salpetersäure nach gründlicher Ansäuerung mittelst konzentrierter Schwefelsäure der organische Stickstoff nach der bekannten Methode *Kjeldahl* ermittelt.

Die salpetrige Säure neben der Salpetersäure wird in besonders abgemessenen Partien nach der modifizierten Methode *Pellet* in einem hierzu speziell konstruierten Apparate festgestellt.

Der Stickstoff in Form von Salpetersäure läßt sich, namentlich wenn diese in größerer Menge vorhanden ist, durch eine andere Methode neben Ammoniak und organischem Stickstoff, speziell bei Gegenwart von Hexosen oder Pentosen, sowie von Disacchariden in der Flüssigkeit nicht genau bestimmen, wovon wir uns durch zahlreiche Beobachtungen überzeugt haben. Die Methode *Jodelbauer* sowie die modifizierte Methode *Förster* geben regelmäßig niedrigere Resultate.

Qualitativ wird die salpetrige Säure, die Salpetersäure und das Ammoniak zumeist nach den bekannten und bewährten Methoden bestimmt. (Das letztere nur in Lösungen, in denen kein Kohlenhydrat vorhanden war, denn Kohlenhydrate geben mit dem *Nessler*schen Reagens, dessen man sich zum Nachweis des Ammoniaks bedient, eine analoge Reaktion.)

XV. Zellulose zersetzende Fähigkeit des Erdbodens.

Neben diesen vorerwähnten Methoden, bei welchen es sich hauptsächlich um die Anreicherung des Stickstoffs durch die stickstoffbindenden Bakterien im Boden, zweitens um die Metamorphose der organischen und anorganischen stickstoffhaltigen Substanzen im Boden handelt, ist es auch von großer Wichtigkeit zu erforschen, ob im Boden genug zelluloselösende Bakterien vorhanden sind.

Die Gärung der Zellulose vollzieht sich in zwei Phasen. Durch die Erreger wird

1. die Wasserstoffgärung der Zellulose,
2. die Methangärung der Zellulose verursacht.

Die Kenntnis dieser Prozesse verdanken wir den *Omelianski*schen Untersuchungen[1], welche den Nachweis lieferten, daß zwei verschiedene

[1]) Siehe Arbeiten *Omelianski*, Zentralblatt für Bakteriologie etc. Abt. II. 1902 und ebenda 1904.

Arten der Zellulosegärung stattfinden, bei welchen sich Wasserstoff oder Methan bildet. Die Bilanz der Wasserstoffgärung der Zellulose stellt sich auf Grund der *Omelianski*schen Untersuchungen wie folgt:

Gärmaterial: Zellulose:		Gärprodukte:	
Zum Versuch verwendet	3·4743 *g*	Fettsäuren . .	2·2402 *g*
Unzersetzt geblieben	0·1272 *g*	Kohlensäure .	0·9722 *g*
Durch die Gärung verschwunden .	3·3471 *g*	Wasserstoff .	0·0138 *g*
		Zusammen .	3·2262 *g*

Was die Zusammensetzung der flüchtigen organischen Säuren anbelangt, so bestehen dieselben aus Butter-, Essig- und wahrscheinlich Valeriansäure.

Die Bilanz der Methangärung der Zellulose stellte sich wie folgt:

Gärmaterial: Zellulose:		Gärprodukte:	
Zum Versuch verwendet	2·0815 *g*	Fettsäuren . .	1·0223 *g*
Unzersetzt geblieben	0·0750 *g*	Kohlensäure .	0·8678 *g*
Durch die Gärung verschwunden .	2·0065 *g*	Wasserstoff .	0·1372 *g*
		Zusammen .	2·0273 *g*

Pringsheim [1]) und *Koch* [2]) wiesen nach, daß die Zellulose sich nicht nur für die gewöhnlichen Bodenbakterien, sondern auch für jene, welche elementaren Stickstoff assimilieren, namentlich für den Azotobakter, als ein gutes Energiematerial bewährt. Nach Angaben von *H. Pringsheim* ist Clostridium Americanum, ein stickstoffbindendes fakultativ anaërobes Bakterium, imstande, in Metabiose mit zelluloselösenden Bakterien eine Ausnutzung dieses schwerlöslichen Energiematerials für die Stickstoffassimilation zu erreichen.

Ganz richtig äußert sich *Pringsheim* auch in einer andern seiner Arbeiten [3]) über diesen Gegenstand. Dort behauptet er nämlich, daß lösliche Kohlenhydrate oder gar höhere Alkohole immer nur in verhältnismäßig geringer Menge in der Erdkruste vorhanden seien und daß sie überdies wegen ihrer leichten Angreifbarkeit zum Teil der großen Zahl der wenig nützlichen Mikroorganismen verfallen, die mit ihrer Hilfe den noch vorhandenen Stickstoff des Bodens in von der Pflanze erst auf dem Umwege anderer Bakterienzersetzungen ausnutzbaren Eiweißstickstoff festlegen. Die Zellulose aber gelangt in Pflanzenresten, Wurzeln, Stengeln und Blättern, letztere besonders im Walde, in verhältnismäßig großem Maße in die oberen Bodenschichten. Ihr Zerfall ist dort ein überraschend schneller, ein weit rapiderer als sich unter Laboratoriumsbedingungen selbst bei den im Boden kaum herrschenden günstigsten Temperaturgraden erreichen läßt.

---

[1]) *H. Pringsheim*, Über die Verwendung von Zellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. Zentralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. **23**. 1909. S. 300 und Bd. **26**. 1910. S. 222.

[2]) *A. Koch*, Über Luftstickstoffbindung im Boden mit Hilfe von Zellulose als Energiematerial. Zentralblatt für Bakteriologie. Abt. II. Bd. **27**. Nr. 1 3. S. 1.

[3]) *H. Pringsheim*, Die Bedeutung stickstoffbindender Bakterien. Biologisches Zentralblatt. Bd. **31**. Nr. 3. 1911. S. 73.

Die Verwendung der Zellulose als Energiematerial für die Bakterien, welche elementaren Stickstoff assimilieren, ist also im Haushalt der Natur von großer Bedeutung.

Die großen Quantitäten der Zellulose, welche mit den abgestorbenen Blättern, Stengeln und Wurzeln stets im Boden zurückbleiben, dienen auch den Denitrifikationsbakterien als vorzügliche Kohlenstoffnährquelle, ohne daß stets eine Nitratgärung verursacht wird. Die Spaltung der Zellulose verläuft in verschiedenen Phasen, und zwar anaërob und aërob. Die anaëroben Prozesse zerfallen in 2 Gruppen:

a) Ohne Anwesenheit von Salpetersäureanhydrid kann Zellulose durch echte anaërobe Bakterien zersetzt werden, wobei Wasserstoff und Kohlensäure oder Methan und Kohlensäure frei werden, während Essigsäure und Buttersäure sich bilden. Dies sind die Wasserstoff- und Methangärung und diese Prozesse allein wurden bis heute studiert und ihnen wurde die Vernichtung der Zellulose in der Natur zugeschrieben.

b) Bei Anwesenheit von Salpetersäureanhydrid kann Zellulose bei Bildung von elementarem Stickstoff und Kohlendioxyd durch denitrifizierende Bakterien zersetzt werden.

Die hierbei wirksamen Bakterien wirken zwar ohne oder bei geringem Luftzutritt, sie sind aber selbst aërob.

Auch bei der aëroben Zersetzung der Zellulose kann man 2 Fälle unterscheiden:

a) Ist das Medium, worin die Zellulose sich befindet, schwach alkalisch, so spielen bei der Zersetzung gewöhnliche aërobe Bakterien die Hauptrolle.

b) Ist das Medium jedoch schwach sauer, so sind dabei Pilze und Mycelien von höheren Fungi wirksam.[1])

Man kann sich leicht überzeugen, inwieweit die Zellulose den Bakterien, welche elementaren Stickstoff assimilieren, sowie den Denitrifikationsbakterien als gute Kohlenstoffnährquelle dienen kann, indem man die früher erwähnte Nährlösung benutzt und anstatt Mannit oder Glukose 20 *g* fein zerteilter Zellulose zur Nährlösung zusetzt und mit dem untersuchten Boden oder Bodenaufschlemmung impft.

Aërobe Zellulosezersetzung.

Zur Anhäufung der Wasserstoff- und Methanbazillen, sowie zur Bestimmung des Wasserstoffs und Methans, welche sich durch den Abbau der Zellulose bilden, bedient man sich folgender Lösung: In 1 *l* destillierten Wassers ist vorhanden:

1 *g* $(NH_4)_2SO_4$
1 *g* K_2HPO_4
0·05 *g* $MgSO_4$
0·02 *g* $NaCl$
25 *g* $CaCO_3$.

[1]) *C. van Iterson* jun., Die Zersetzung von Zellulose durch aërobe Mikroorganismen. Zentralblatt f. Bakteriologie etc. Bd. **11**. II. Abteilung. 1904.

Die großen *Erlenmeyer*schen Kolben werden mit 500 cm^3 der Lösung gefüllt und sodann 10 *g* fein zerteilten Filtrierpapieres (in Form von Papierbrei) und 50 *g* der untersuchten Erde hinzugefügt. Hierauf werden die Kolben gut zugestöpselt und im Thermostat bei 30—35° C belassen. Nach Ablauf von 15—30 Tagen kann man dann die sich gebildete Menge von Methan oder Wasserstoff feststellen. Aus der nach einer bestimmten Zeit konstatierten Menge des Wasserstoffs und Methans läßt sich dann sowohl auf die Intensität des Zersetzungsprozesses der Zellulose als auch auf die Anhäufung der Zellulosegärungserreger schließen.

Methode zur Bestimmung der zellulosezersetzenden Fähigkeit des Erdbodens nach *Harald R. Christensen.*[1])

In einen 300 cm^3 fassenden Jenaer Erlenmeyerkolben wird eine 50 *g* Trockenerde entsprechende Menge des zu untersuchenden Bodens gebracht. Mit einem Glasspatel wird die Erde auf dem Kolbenboden in der Weise angeordnet, daß auf ca. $^4/_5$ desselben eine gleichmäßig starke, lose liegende, jedoch überall zusammenhängende Schicht vorhanden ist; ca. $^1/_5$ des Kolbenbodens bleibt unbedeckt; durch eine Pipette wird dann langsam und vorsichtig destilliertes Wasser auf den unbedeckten Teil des Kolbenbodens gebracht; dieses Wasser wird (durch Drehung des Kolbens) von der Erde kapillär aufgesaugt, ohne deren Struktur zu zerstören. Es wird so viel Wasser zugeführt, daß die Erde beinahe mit Wasser gesättigt wird. Eine Übersättigung darf nicht eintreten. Es ist von Wichtigkeit, daß das Wasser in der angegebenen Weise zugeführt wird. Wenn nämlich das Wasser direkt auf die Erde gegossen wird, dann wird dieselbe zusammengeschlemmt und verliert ihre lockere Struktur, wodurch ihre zellulosespaltende Fähigkeit etwas verringert wird.

Auf die in dieser Weise befeuchtete Erde werden jetzt in passender Entfernung zwei schmale, bei allen vergleichenden Untersuchungen aber gleich große Streifen aschenfreien Filtrierpapiers (Länge 30 *mm*, Breite 5 *mm*) gelegt; dieselben werden durch eine Glasstange gegen die Erde gedrückt, damit sie überall mit den Teilen derselben in Berührung kommen. Es ist wichtig, darauf zu achten, daß das Papier durch die Erde nicht allzu viel beschmutzt wird, weil die Beobachtung der Zellulosezersetzung dadurch erschwert wird.

Nach dem Verlauf kürzerer oder längerer Zeit — weniger Tage bis mehrerer Wochen — sieht man, daß das Papier angegriffen wird. Gewöhnlich entstehen anfangs hie und da auf dem Papier kleine, runde und scheinbar fast durchsichtige Fleckchen; oft sieht man aber auch die Zersetzung an den Enden oder den Seiten der Papierstückchen eintreten. Bei der Dekomposition wird die Papierzellulose gewöhnlich nach und nach in einen zähen, graulichen Schleim, worin die zellulosespaltenden Mikroben

[1]) *Harald R. Christensen*, Zentralblatt für Bakteriologie etc. Abt. II. Bd. 27. Nr. 17/21. 1910.

enthalten sind, umgebildet. Zuweilen, und — wie es scheint — besonders, wenn der Abbau der Zellulose durch Schimmelpilze hervorgerufen wird, tritt eine Schwarzfärbung des Papiers ein, und die Zersetzung kann dann ohne Schleimbildung zu Ende geführt werden. An jedem dritten Tag werden über das Fortschreiten der Zellulosezersetzung Aufzeichnungen gemacht, und dasselbe wird mit den Zahlen 0—4 charakterisiert. Die Zahl 0 bezeichnet, daß das Papier unverändert geblieben ist, 1, daß die Zellulosespaltung gut eingeleitet und ca. $^1/_4$ des Papiers zersetzt, 4, daß die Zersetzung ganz oder beinahe ganz vollendet ist, und 2 und 3 die dazwischenliegenden Stufen. Die beiden in den einzelnen Kolben angebrachten Papierstücke werden in den meisten Fällen gleich rasch zersetzt; zuweilen kann jedoch die vollendete Zersetzung des einen Papierstückchens derjenigen des zweiten um einige Tage vorausgehen. In derartigen Fällen wird dann die Spaltung zu dem Zeitpunkt, wo das erstere Stückchen vollkommen zersetzt ist, mit 4 charakterisiert.

Das während des Versuches (aus den mit Wattestöpseln verschlossenen Kolben) verdunstete Wasser wird hie und da wieder ersetzt; es wird darauf geachtet, daß die Erde stets so viel Feuchtigkeit enthält, daß die Papierstückchen durch und durch naß bleiben.

Bei sorgfältigem Arbeiten läßt sich durch dieses Verfahren bei vergleichenden Untersuchungen eine sehr gute Übereinstimmung erhalten. Die zu einer vollständigen Zellulosezersetzung erforderliche Zeit schwankt bei diesen Untersuchungen von ca. 50 verschiedenen Ackerböden zwischen 9 und 93 Tagen.

Durch unsere Versuche haben wir uns von der verschiedenen Geschwindigkeit des Zelluloseabbaues bei dem mit Azotobacter geimpften und ungeimpften Boden überzeugt. In dem geimpften Boden ging der Abbau der Zellulose viel schneller vor sich als bei dem ungeimpften. Interessant war der Fall bei dem Boden, welcher schon über 15 Jahre mit Stallmist nicht gedüngt wurde und bei demjenigen, welcher eine reichliche Stallmistdüngung erhalten hatte. Bei dem ersteren ging die Zellulosezersetzung erst nach 70 Tagen, bei dem letzteren schon nach 23 Tagen vor sich. Daraus ist ersichtlich, daß in denjenigen Böden, die reich an Bakterien, welche elementaren Stickstoff assimilieren, sowie Ammonisationsbakterien und Denitrifikationsbakterien sind, der Abbauprozeß der Zellulose viel rascher verläuft als bei bakterienarmen Böden.

Äußerst interessante Resultate erhielten wir bei den Untersuchungen über die zellulosezersetzende Fähigkeit des Stadtbodens von Prag, welcher von Abwässern stark verunreinigt war. In diesem Boden ist der Abbauprozeß der Zellulose äußerst schnell vor sich gegangen; schon nach 8 Tagen war die Zellulose völlig zersetzt. Meinen Untersuchungen gemäß kann ich erklären, daß die Methode *Harald Christensens* ein deutliches Bild über die zellulosezersetzende Fähigkeit verschiedenartiger Böden liefert.

XVI. Methoden zum Nachweis der Bakterien im Boden, welche Kohlenhydrate abbauen, nach Julius Stoklasa.

Von großer Bedeutung ist die Frage, ob virulente Bakterien im Boden vorkommen, welche einen raschen Abbau der Kohlenhydrate hervorrufen. Wenn der Abbau der Kohlenhydrate bei Sauerstoffzutritt erfolgt, so verlaufen im Boden günstige biochemische Prozesse; bei Sauerstoffabschluß hingegen bilden sich große Mengen von organischen Säuren, namentlich von Essig-, Ameisen- und Buttersäuren, welche ungemein schädlich auf die Wurzelhaare wirken und das ganze Wurzelsystem beschädigen.

Um in Erfahrung zu bringen, ob im Boden Bakterien existieren, welche die Kohlenhydrate schnell abbauen, geht man wie folgt vor:

1. Wird die Menge des von den Mikroorganismen in 1 *kg* Boden mit 25% Wasser bei 20° C ausgeatmeten Kohlendioxyds nach 20tägiger Beobachtung bestimmt.

2. Werden zu 1 *kg* Boden mit 25% Wasser 10 *g* Glukose zugesetzt und abermals die Menge des von den Mikroorganismen bei 20° C ausgeatmeten Kohlendioxyds nach 20tägiger Beobachtung festgestellt.

3. Werden zu 1 *kg* Boden mit 25% Wasser 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reines Kalziumkarbonat hinzugefügt und wiederum die Menge des von den Mikroorganismen bei 20° C ausgeatmeten Kohlendioxyds nach 20tägiger Beobachtung ermittelt.

Der Atmungsprozeß verläuft

1. bei Durchleitung von 20 *l* kohlendioxyd-, salpetersäure-, ammoniak- und keimfreier Luft und

2. bei Wasserstoffatmosphäre.

Das Arrangement und die Ausführung dieser Versuche ist genau so, wie bei der aëroben und anaëroben Atmung der Mikroorganismen im Boden bereits beschrieben wurde.

Ich führe hier einige Resultate unserer Versuche an:

1. Ein guter, fruchtbarer Lehmboden.

Aërobiose.

Von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser werden bei 20° C nach 20tägiger Beobachtung 0·962 *g* CO_2, bei Zusatz von 10 *g* Glukose 14·94 *g* CO_2 und bei Zusatz von 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reinen Kalziumkarbonats 15·28 *g* CO_2 gebildet.

Anaërobiose:

Von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser werden bei 20° C nach 20tägiger Beobachtung 0·235 *g* CO_2, bei Zusatz von 10 *g* Glukose 8·386 *g* CO_2 und bei Zusatz von 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reinen Kalziumkarbonats 12·565 *g* CO_2 gebildet.

2. Ein schwerer, wenig fruchtbarer Tonboden.

Aërobiose.

Von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser werden bei 20° C nach 20tägiger Beobachtung 0·288 *g* CO_2, bei Zusatz von 10 *g* Glukose 9·53 *g* CO_2 und bei Zusatz von 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reinen Kalziumkarbonats 13·811 *g* CO_2 gebildet.

Anaërobiose:

Von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser werden bei 20° C nach 20tägiger Beobachtung 0·174 *g* CO_2, bei Zusatz von 10 *g* Glukose 9·686 *g* CO_2 und bei Zusatz von 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reinen Kalziumkarbonats 11·732 *g* CO_2 gebildet.

In dem guten Lehmboden verläuft der Abbauprozeß der Glukose durch die Bakterien bei Sauerstoffzutritt in einer normalen Weise und es bilden sich nicht viele organische Säuren. Die Menge des ausgeatmeten Kohlendioxyds bei Zusatz von Glukose ist fast dieselbe wie bei Hinzufügung von Kalziumkarbonat.

Bei Sauerstoffabschluß findet schon eine Bildung von größeren Quantitäten organischer Säuren statt, welche dann auf das zugesetzte Kalziumkarbonat einwirken und die Kohlensäure in Freiheit setzen.

Bei dem schweren, wenig fruchtbaren Tonboden finden wir, daß der Abbauprozeß der Glukose nicht normal vor sich geht und eine Bildung von beträchtlichen Mengen organischer Säuren sowohl bei Sauerstoffzutritt, als auch bei Sauerstoffabschluß stattfindet.

Die Bildung organischer Säuren aus der Glukose findet namentlich in einem Humusboden mit saurem Charakter statt.

3. Ein saurer Humusboden.

Aërobiose.

Von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser werden bei 20° C nach 20tägiger Beobachtung 0·554 *g* CO_2, bei Zusatz von 10 *g* Glukose 8·62 *g* CO_2 und bei Zusatz von 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reinen Kalziumkarbonats 13·48 *g* CO_2 gebildet.

Anaërobiose:

Von den Mikroorganismen aus 1 *kg* Boden mit 25% Wasser werden bei 20° C nach 20tägiger Beobachtung 0·483 *g* CO_2, bei Zusatz von 10 *g* Glukose 7·48 *g* CO_2 und bei Zusatz von 10 *g* Glukose und 20 *g* chemisch reinen Kalziumkarbonats 13·04 *g* CO_2 gebildet.

Wie wir hier sehen, war bei diesem Boden sowohl in Aërobiose als auch in Anaërobiose eine starke Bildung organischer Säuren zu beobachten.

Diese hier angeführte Methode führt uns zu der Überzeugung, daß der schwere, wenig fruchtbare Tonboden, sowie der saure Humusboden einer starken Kalkdüngung bedürfen, wenn der Abbau der Kohlenhydrate und organischen Säuren im Boden normal verlaufen soll. Ebenso interessante Ergebnisse erhielten wir bei Anwendung von Zellulose und Xylan anstatt Glukose.[1]

[1] In kürzester Zeit erscheint eine ausführliche Arbeit, in der die Ergebnisse der Experimente mit allen Kohlenhydraten, die im Boden existieren, publiziert werden.

XVII. Einige Bemerkungen über Bakterien, welche auf die Pflanzen schädliche Wirkungen ausüben.

Man nimmt allgemein an, daß die Bakterien im Boden auf die Entwicklung der Pflanzen einen ausschließlich günstigen Einfluß ausüben, doch besteht diese Anschauung nicht zu Recht. Wie ich nach meinen Erfahrungen behaupten kann, wirken manche Bakterien sehr schädlich auf das Wurzelsystem der Pflanzen ein, und zwar besonders in solchen Böden, in welchen ein Mangel an Sauerstoff herrscht und anaërobe Prozesse der Bakterien zur Geltung kommen. Dies ist namentlich bei solchen Böden der Fall, welche eine kleine Luftkapazität besitzen oder in welchen durch starke Düngung von Chilisalpeter Verkrustungen eintraten, ferner in Böden, die unter zu großer Nässe leiden usw.

Ich habe schon vor 12 Jahren[1]) darauf aufmerksam gemacht, daß manche Pflanzenkrankheiten, namentlich der Wurzelbrand, in vielen Fällen durch Sekrete, welche anaërobe Bakterien ausscheiden, hervorgerufen werden, ganz besonders dann, wenn im Boden leicht abbaufähige organische Substanzen vorhanden sind, wie z. B. nach einer frischen Stallmistdüngung.

Desulfurikatoren im Boden.

Den Arbeiten *Beijerincks* und *Deldens* haben wir es zu verdanken, daß anaërobe Bakterien aus dem Boden isoliert wurden, welche die Fähigkeit besitzen, Sulfate leicht zu Schwefelwasserstoff zu reduzieren.

Es ist ja bekannt, daß zahlreiche Bakterienarten in Fleischbouillon Schwefelwasserstoff bilden, wie an einem angehängten Bleiacetatpapierstreifen erkannt werden kann. Kräftige Entwicklung erhält man, wenn man Bouillon mit etwas Schwefelblume versetzt und mit Erde impft.

Nach unseren Untersuchungen sind diese Bakterienarten namentlich in städtischen und allen jenen Böden stark vertreten, in denen Substanzen des tierischen Stoffwechsels in Verwesung begriffen sind.

Der Schwefelwasserstoff beeinträchtigt die Entwicklung des Wurzelsystems im Boden ungemein. Schon ganz minimale Mengen dieser Verbindung verursachen den Tod der betreffenden Pflanzen. Das erste Symptom der Erkrankung ist stets die Zersetzung des Chlorophyllfarbstoffes, der alsbald in den plasmatischen Zellinhalt überzutreten beginnt. Sodann folgt ein Verschwinden der Grenzen der einzelnen Chloroplasten bis auf einen körnigen Rückstand, der in der Mitte der gesamten wolkig-trüben, bleich gelbgrünen Plasmamasse zusammengezogen ist.

Was die Methoden zum Nachweis der schwefelwasserstoffbildenden Bakterien anbelangt, so wurden solche von *O. Loew*, *R. Emmerich* und *W. Graf zu Leiningen*[2]) erfunden.

---

[1]) *Julius Stoklasa*, Betrachtungen über die Krankheiten der Zuckerrübe in den Jahren 1896/97. Zeitschrift für Zuckerindustrie in Böhmen. XXII. 1897/98. — Derselbe, Wurzelbrand der Zuckerrübe. Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. Abt. II. Bd. 4. 1898.

[2]) *O. Loew, R. Emmerich* und *W. Graf zu Leiningen*, Über schädliche Bakterientätigkeit im Boden und über Bodensäuberung. Zentralblatt für Bakteriologie etc. Bd. 29. Nr. 23, 25. 1911.

Der Nachweis von schwefelwasserstoffbildenden Bakterien in Böden geschah in folgender Weise: Es wurden 2 *g* Boden — bei gröberen Bodenarten nur die Feinerde mit ca. 0·2 *g* Gips[1]) gemischt und mit 3—5 cm^3 sterilisierter Lösung von folgender Zusammensetzung in einem ungefähr 10 cm^3 fassenden Kölbchen mit aufgesetztem Röhrchen, in welches ein Streifen Bleipapier eingeschoben war, bei 32—34° einige Tage belassen.

Die Lösung enthielt:

Äthylalkohol	2%	Dikaliumphosphat	0·2%
Essigsaures Natron . . .	0·5%	Magnesiumsulfat	0·02%
Ammonsulfat	0·1%		

Diese Lösung war zuerst von *O. Loew* bei Untersuchungen über müde Böden Portoricos angewendet worden, ebenso die weiter unten bei Denitrifikation erwähnte Alkoholnährlösung. Ein spezieller Versuch lehrte, daß nur ein Zusatz von Gips ein ziemlich rasches Eintreten der Reaktion ermöglicht und die anderen Sulfate der Lösung nur unwesentlich in Betracht kommen. Äthylalkohol wurde deshalb gewählt, weil er eine gute Kohlenstoffnährquelle für die meisten Denitrifikanten ist.

Wenn nun Schwefelwasserstoff entstand, so mußte er durch das enge Röhrchen passieren und hier das eingelegte Bleipapier schwärzen. Die Reaktion trat bei manchen Böden schon nach 2 Tagen, bei anderen aber erst nach 5—6 Tagen ein. Ein Lehmboden, der sich fest absetzt, wird selbst bei gleichem Gehalt an Desulfurikatoren den etwa entstehenden Schwefelwasserstoff langsamer an die Luft über der Flüssigkeit abgeben als ein trockener Sandboden. Unseren Erfahrungen gemäß ist in den Städteböden und in städtischen Gartenböden, wo keine Kanalisation ist, ein reichliches Vorhandensein von Desulfurikatoren anzunehmen.

Es ist noch zu erwähnen, daß zahlreiche Schwefelwasserstoffbildner unter Umständen auch Merkaptane entstehen lassen, sei es, daß sie dies direkt formieren oder daß es aus der Vereinigung von Schwefelwasserstoff und Alkoholen hervorgeht.

Stickstofftrioxydbildung im Boden.

Im Verlaufe des Atmungsprozesses vieler Bakterien entsteht Wasserstoff. Wasserstoff im statu nascendi reduziert die Salpetersäure im Boden zu salpetriger Säure.

Unseren Untersuchungen zufolge ist die salpetrige Säure besonders den Wurzeln der jungen Rüben- und Gerstenpflanzen sehr schädlich, zumal bei Abwesenheit von Sauerstoff oder wenn nur geringe Mengen dieses Elementes zugegen sind. Des weiteren haben wir gefunden, daß die salpetrige Säure in Böden, die eine nur kleine Luftkapazität besitzen, und namentlich in Tonböden ganz bedeutende pathologische Zustände der jungen Vegetation hervorrufen kann. Auf solchen Böden, die eine kleine Luftkapazität besitzen, ist es nicht ratsam, kurz vor der Saat Chilisalpeter

[1]) Der Gips wird mit sterilisiertem Wasser im strömenden Dampf erhitzt und als dicker Brei steril aufbewahrt. Einige Tropfen desselben genügten bei jeder Probe.

anzuwenden. Es ist speziell hervorzuheben, daß Stickstofftrioxyd namentlich für die junge Vegetation der Gymnospermae ungemein schädlich ist.

Von den Bakterien sind es hauptsächlich die Denitrifikanten, welche sehr energisch die Salpetersäure in salpetrige Säure überführen.

Den Nachweis des Denitrifikationsvermögens des Bodens haben wir schon im vorherigen Kapitel ausführlich besprochen.

Eisenbakterien im Boden.

Im Boden kommt Eisen in organischen Verbindungen, namentlich als Ferri- und Ferrohumaten vor. Aus diesen assimilieren die Eisenbakterien organische Stoffe, Eisen scheidet sich dann in Form von Eisenoxydhydrat ab und bildet eine schleimige, gelbbraune Masse. Die Eisenbakterien finden in den Ferri- und Ferrohumaten eine gute Kohlenstoffnährquelle.

E. Ramann[1]) hat schon früher die Ansicht geäußert, daß Eisenbakterien von im Wasser gelösten organischen Stoffen leben, sie zerstören und hierdurch die Eisenverbindungen zur Abscheidung bringen. Nach den jetzt herrschenden Auffassungen würden die organischen Schutzkolloide zerstört werden und hierdurch das Gel des kolloiden Eisenoxydhydrates zur Abscheidung kommen. Für diese Auffassung spricht, daß auch Tonerde, Eisenphosphate und -Silikate in den Raseneisensteinen reichlich vorkommen, deren Abscheidung dann verständlich wird.

Diese Prozesse spielen sich namentlich in solchen Böden ab, welche reich an Humusstoffen, Eisenverbindungen und Wasser sind. Das abgeschiedene Eisenoxydhydrat setzt sich dann auf das Wurzelsystem der Pflanzen und beeinträchtigt stark die Atmungsprozesse. Namentlich die jungen Pflanzen leiden darunter sehr. Es kommt auch sehr oft vor, daß bei starkem Ansatz von Eisenoxydhydrat auf dem Wurzelsystem der Tod der Pflanzen herbeigeführt wird. Nach unseren Untersuchungen wurde sehr häufig der Wurzelbrand der Zuckerrübe durch starke Verbreitung der Eisenbakterien in humusreichen Böden hervorgerufen.

Das Vorhandensein von Eisenbakterien im Boden, namentlich der Cladothrix- und Crenothrixgattungen, kann dadurch nachgewiesen werden, daß man ein Durchschnittsmuster von 100 *g* Boden mit 500 cm^3 Wasser mischt, 0·5 *g* Eisenammonzitrat zusetzt, in großen zugedeckten Zylindern von 1 *l* Inhalt aufbewahrt und bei 20° C stehen läßt. Nach einer bestimmten Zeit scheiden sich dann gelbliche Häute und Flocken von Eisenbakterien ab. Ich verweise hier auf die hochinteressante Arbeit von *H. Molisch*, „Über die Eisenbakterien". Jena 1910.

XVIII. Die biologische Absorption.

In dem Bodenchemismus spielen bekanntlich die chemischen Absorptionserscheinungen eine hervorragende Rolle und sind daher auch bereits vielfach Gegenstand gediegener Bearbeitung gewesen. Wenn wir die ganze

[1]) *E. Ramann,* Bodenkunde. Verlag von Julius Springer. Berlin 1911. S. 430.

Literatur über die Absorptionsvorgänge im Boden überblicken, finden wir, daß uns das innerste Wesen dieser Erscheinungen noch immer nicht klar ist und dies demgemäß derzeit noch ein ungelöstes Problem ist. Bei dem Studium der Absorptionsvorgänge unterließ man leider stets, die biologische Absorption in Berücksichtigung zu ziehen, wiewohl dieser neben der chemischen Absorption im Boden eine hochwichtige Aufgabe zugewiesen ist. Die biologische Absorption ist eigentlich nichts anderes als die Assimilation der einzelnen Ionen durch die lebenden Mikroorganismen im Boden. Die Ursache der biologischen Absorptionserscheinungen ist eine andere als die der chemischen Absorptionserscheinungen. Bei der chemischen Absorption der Säuren nimmt man allgemein an, daß das Sulfat-Ion, Chlor-Ion, Nitrat-Ion gar nicht oder nur sehr schwach absorbiert wird. Nur die Phosphat-Ionen werden in erheblichem Maße absorbiert. Aus zahlreichen Versuchen über das chemische Absorptionsvermögen der Böden geht weiter hervor, daß die verschiedenen Basen in verschiedenem Grade absorbiert werden, am stärksten das Ammonium- und Kali-Ion, am schwächsten das Natrium-Ion.

Nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse auf dem Gebiete der chemischen Absorptionserscheinungen erfolgt die Absorption der Salze wie die ihrer Ionen.[1]) Säuren, die unlösliche Salze bilden, werden absorbiert, Säuren, die lösliche Salze bilden, werden nicht absorbiert und verbinden sich in der Regel mit den bei Absorption durch Austausch frei werdenden Basen oder verbinden sich mit im Boden vorhandenen, leicht angreifbaren Stoffen, namentlich unter Austreiben von Kohlensäure mit Kalziumkarbonat und Magnesiumkarbonat. Die Größe der Absorption ist abhängig von dem Verhältnis der angewendeten Bodenmenge zur Quantität der Lösung und der Menge des gelösten Körpers oder mathematisch gesprochen: Die Absorptionsgröße ist eine Funktion der drei Variablen: Bodenmenge, Quantität der Lösung und Menge des darin gelösten Stoffes, natürlich für ein und denselben Boden. Die mitgeteilten Ergebnisse werfen aber auch ein Licht auf den chemischen Charakter der bei dieser Absorption stattfindenden Vorgänge, indem sie deutlich auf jene Prozesse hinweisen, die man als sogenannte chemische Massenwirkungen bezeichnet.

Die Annahme einer spezifischen Absorption der Ionen ist deshalb wahrscheinlich, weil die Änderungen der Oberflächenspannung der Salzlösungen sich additiv zusammensetzen, wobei jedes Ion mit einem charakteristischen Werte teilnimmt. Die großen Elektrizitätsmengen der Ionen werden aber bereits bei geringem Überschuß von Ionen verschiedener Ladung zu so großen Potentialdifferenzen führen, daß eine direkte Spaltung eines Salzes nicht oder nur unter Eintritt sekundärer Reaktionen stattfinden wird.

Die biologische Absorption der einzelnen Ionen verläuft in den humiden und ariden Gebieten ganz anders als die chemische Absorption. Es werden durch die lebenden Mikroorganismen alle Elemente assimiliert,

[1]) *E. Ramann*, Bodenkunde. Verlag von Julius Springer. Berlin 1911. S. 60.

welche sie zum Aufbau neuer lebender Zellen benötigen, und in organische Verbindungen umgewandelt. Wie wir uns durch ausführliche Versuche mit stickstoff-, phosphor-, schwefel-, chlor-, kalium-, natrium-, kalzium-, magnesium-, aluminium-, eisen- und manganfreien Nährlösungen überzeugt haben, sind es namentlich Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Magnesium, Aluminium und Eisen, welche für die Entwicklung und Vermehrung jener Gruppen der Bakterien, die sich an dem Kreislauf des Stickstoffs im Boden beteiligen, unentbehrlich sind.

Azotobacter chroococcum.

In der Trockensubstanz wurde gefunden:

Stickstoff	11·3%	Magnesiumoxyd	0·82%
Phosphorsäureanhydrid . .	4·93%	Kalziumoxyd	0·34%
Schwefelsäureanhydrid . .	0·29%	Eisenoxyd	0·08%
Kaliumoxyd	2·41%	Reinasche	9·66%
Natriumoxyd	0·07%		

Bacillus mycoides.

In der Trockensubstanz wurde gefunden:

Stickstoff	10·84%	Magnesiumoxyd	0·48%
Phosphorsäureanhydrid . .	4·07%	Kalziumoxyd	0·56%
Schwefelsäureanhydrid . .	0·49%	Eisenoxyd	0·05%
Kaliumoxyd	2·27%	Reinasche	8·50%
Natriumoxyd	0·12%		

Bac. fluorescens liquefaciens.

In der Trockensubstanz wurde gefunden:

Stickstoff	9·74%	Magnesiumoxyd	0·33%
Phosphorsäureanhydrid . .	5·02%	Kalziumoxyd	0·42%
Schwefelsäureanhydrid . .	0·38%	Eisenoxyd	0·06%
Kaliumoxyd	0·83%	Reinasche	7·78%
Natriumoxyd	0·21%		

Zum komplexen Aufbau speziell formativer und plastischer Stickstoffverbindungen (Proteïne, Nukleoproteïde etc.) wird von den Mikroorganismen im Boden der Stickstoff in elementarer Form, das Ammonium-Ion, Nitrat-Ion, Sulfat-Ion, Phosphat-Ion etc. assimiliert. Bei der Assimilation der einzelnen Ionen müssen alle normalen Vegetationsbedingungen vorhanden sein, namentlich eine geeignete Kohlenstoffnährquelle, alle übrigen anorganischen Nährstoffe, eine gute Konzentration der Nährlösung, eine günstige Temperatur und eine gewisse Zeit.

Um sich davon zu überzeugen, ob tatsächlich eine biologische Absorption stattgefunden hat, darf man den Prozeß nicht wie *Fesca*[1]), *Knop*[2]),

---

[1]) *Fesca*, Beiträge zur agronom. Bodenuntersuchung und Kartierung. Berlin 1882. S. 31

[2]) *W. Knop*, Die Bonitierung der Ackererde. Leipzig 1872. S. 49.

Pillitz[1] und *Zalomanoff*[2]) bloß 2 oder 3 Tage verfolgen, sondern mindestens 30 Tage bei einer Temperatur in der Brutkammer von 25—30° C.

In meiner Versuchsstation wurden nachstehende diesbezügliche Experimente ausgeführt:

Wir verwendeten 8 lange Glasröhren von 5 *cm* Durchmesser mit einer trichterförmigen Einschnürung. Diese letztere wurde mit Baumwolle verschlossen und über dieser Baumwolle befand sich eine 2 *cm* hohe Schichte von Glasperlen. Die Glasröhren umhüllten wir mit starkem schwarzem Papier und füllten sie mit 250 *g* Lehmboden (Heideboden), welcher von einer gleichmäßigen physikalischen Beschaffenheit war. Da die gröberen Bodengemengteile ein kleines Absorptionsvermögen besitzen, verwendeten wir stets den durch das 0·2 *mm*-Sieb gegebenen Gesamtboden.

Der Boden von vier Röhren blieb ungeimpft, der von den anderen vier Röhren wurde mit Kultur von Bacillus mycoides geimpft. Zu dem Impfmaterial wurde 1 *g* d-Glukose und 0·1 *g* Pepton zugesetzt. Die Impfung wurde in der Brutkammer bei einer Temperatur von 25° C binnen 10 Monaten viermal vorgenommen. Nach dieser Zeit, als wir uns schon überzeugt hatten, daß in den vier geimpften Röhren eine starke Entwicklung der Kultur von Bacillus mycoides stattgefunden hat, sind wir an das weitere Experimentieren geschritten. Zur Bestimmung des Absorptionsvermögens des Phosphat-Ions wurde folgende Lösung zubereitet:

10 *g* $CaH_4(PO_4)_2 . H_2O$ wurden in 2000 cm^3 Wasser gelöst, so daß in 1000 cm^3 Wasser 2·83 *g* Phosphorsäureanhydrid enthalten waren. Für jedes Rohr ließ man 200 cm^3 monokalziumphosphathaltiges Wasser 23 Tage lang mit der gleichen Geschwindigkeit durchsickern. Nach 23 Tagen wurde der Inhalt der Glasröhren mit dem gleichen Quantum destillierten Wassers durchgewaschen, damit das Filtrat mit dem Waschwasser von jedem einzelnen Rohr 500 cm^3 beträgt. Nach dieser Zeit wurde gefunden, daß in den ungeimpften Röhren vom Gesamtphosphorsäureanhydrid 62%, bei den geimpften 98% absorbiert wurden. Die Absorptionsprozesse verliefen ebenfalls bei 25° C.

Das Absorptionsvermögen des geimpften und ungeimpften Bodens, welch beide ein und dieselbe chemische und physikalische Beschaffenheit aufwiesen, variierte also ungemein. Durch unsere vorstehend beschriebenen Experimente wurde der eklatante Beweis erbracht, daß eine biologische Absorption des Phosphat-Ions im Boden tatsächlich stattgefunden hat. Das biologische Absorptionsvermögen der verschiedenen Bodenarten steht gewiß in einer engeren Beziehung zu der Ernährung der höheren Pflanzen und ist für die Beurteilung der Fruchtbarkeit des Bodens sicherlich von großer Bedeutung.

Um zu eruieren, wie sich der geimpfte und der ungeimpfte Boden zu der Erhöhung der Pflanzenproduktion verhalten, haben wir die Versuche in derselben Weise, wie bereits geschildert wurde, nochmals wiederholt.

[1]) *W. Pillitz*, Zeitschr. f. anal. Chemie, 1875, 14, 55 und 282.

[2]) *N. Zalomanoff, Jul. Kühn*, Berichte des landw. Instituts. Halle a. S. 1880. S. 40.

Wir füllten 4 Vegetationsgefäße mit je 18 *kg* desselben Heidebodens, den wir für unsere Absorptionsversuche benutzten. Diese Versuche teilten wir in zwei Gruppen ein, und zwar:

I. Gruppe der Vegetationsgefäße. Für jeden Topf wurden 250 *g* ungeimpften Bodens aus den Röhren vorsichtig herausgenommen. Hierauf wurde diese Bodenmenge mit 500 cm^3 nichtabsorbierten Monokalziumphosphats begossen.

II. Gruppe der Vegetationsgefäße. Jedes Vegetationsgefäß erhielt 250 *g* geimpften Bodens [1]), welche Bodenmenge sodann ebenfalls mit 500 cm^3 nichtabsorbierten Monokalziumphosphats begossen wurde.

Für die biologischen Absorptionsversuche wurde für ein Rohr 200 cm^3 Lösung mit 0·566 *g* Phosphorsäureanhydrid in Form von $CaH_4(PO_4)_2 . H_2O$ benutzt. Dasselbe Quantum, jedoch in verschiedenartigen Absorptionsformen, erhielt jedes Vegetationsgefäß. In jedem Vegetationsgefäß befanden sich sechs Gerstenpflanzen. Wir wählten aus diesem Grunde Gerste als Versuchsobjekt, weil selbe auf die An- oder Abwesenheit des Phosphat-Ions sehr stark reagiert. Bei diesen Experimenten erzielten wir folgende Erträge:

I. Gruppe: Ungeimpfter Boden aus den Röhren.

	Ertrag	
	Frucht	Stroh
1. Vegetationsgefäß	14·32 *g*	21·16 *g*
2. Vegetationsgefäß	13·57 *g*	20·68 *g*

II. Gruppe: Geimpfter Boden aus den Röhren.

1. Vegetationsgefäß	18·86 *g*	24·65 *g*
2. Vegetationsgefäß	20·53 *g*	25·84 *g*

Unsere Beobachtungen haben ergeben, daß die Impfung der Böden entschieden zur Erhöhung des Ertrages der Gerste beiträgt. Das Steigen der Pflanzenproduktion läßt sich dadurch erklären, daß durch die erhöhte Lebenstätigkeit der Bakterien im geimpften Boden die Nährstoffe des Bodens mobilisiert und leichter von dem Wurzelsystem der Pflanzen assimiliert werden können.

Sehr interessante Ergebnisse erzielten wir durch die Anwendung sterilisierter und nichtsterilisierter Böden, die verschiedene Ertragsfähigkeiten besaßen. Bei dem sterilisierten Boden wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid 48—86%, bei dem nichtsterilisierten Boden 52—99·8% Phosphorsäureanhydrid absorbiert.

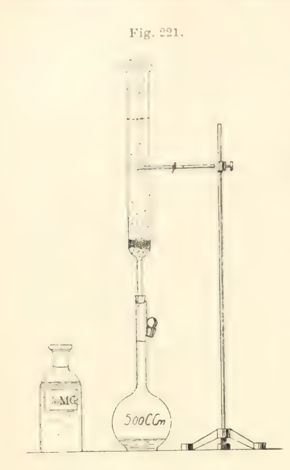
Versuchsmethodik.

Die diesbezüglichen Versuche werden in nachstehender Weise ausgeführt:

[1]) Das Impfmaterial für diese Versuche enthielt bloß Kulturen von Bac. mycoides und Glukose. Pepton wurde nicht angewendet.

Man verwendet 4 gleich lange Glasröhren von 5 *cm* Durchmesser mit einer trichterförmigen Einschnürung. (Siehe Fig. 221.) Diese Einschnürung wird mit Baumwolle verschlossen und über dieser Baumwolle befindet sich eine 2 *cm* hohe Schichte von kleinen Glasperlen. Die Röhren werden mit 250 *g* frischem Boden (befreit von Steinen) gefüllt. In diesem Boden wird das Wasser bestimmt. Die Glasröhren müssen in einer solchen Größe gewählt werden, daß der leere Raum über der Bodenschichte 7 *cm* beträgt, so daß bei den nichtsterilisierten Röhren die Luft zum Boden vollen Zutritt hat. Die Bodenschichte muß in allen 4 Röhren gleich hoch sein. Zwei Röhren werden in strömendem Dampf gründlich sterilisiert und mit Baumwolle verstopft. Nach dem Sterilisationsprozeß werden dann alle 4 Röhren in eine Brutkammer gestellt und dort bei 25° C die Absorptionsversuche vorgenommen.

Fig. 221.



Zur Beobachtung des Verhaltens der Mikroorganismen im Boden zu den Nährlösungen verwendet man zweckmäßig folgende Salze:

Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Kaliumnitrat, Kalziumnitrat, Monokalziumphosphat, Kaliumchlorid, Kaliumsulfat und Magnesiumsulfat. Man stellt sich die $^1/_{10}$-Normallösung dieser Salze am besten dadurch her, daß man $^1/_{10}$ ihres Molekulargewichtes in Grammen abwiegt und in 1000—2000 *cm*³ destillierten Wassers bei 16° C löst. Die Lösung wird hernach sterilisiert und mit Chloroform versetzt.

Man benutzt also $^1/_{10}$ Molekulargewicht von

$(NH_4)_2SO_4$	= 13·22 *g*	$CaH_4(PO_4)_2 . H_2O$ . . .	= 25·21 *g*
NH_4Cl	= 5·35 *g*	KCl	= 7·46 *g*
$(NH_4)NO_3$	= 8·01 *g*	K_2SO_4	= 17·44 *g*
$NaNO_3$	= 8·51 *g*	$MgSO_4 + 7 aq.$	= 24·66 *g*
$Ca(NO_3)_2$	= 16·2 *g*		

Versuche über die Absorption des Phosphat-Ions.

Zur Bestimmung des biologischen Absorptionsvermögens des Phosphat-Ions wird die Lösung so zubereitet, daß man 25·2 *g* $CaH_4(PO_4)_2 . H_2O$[1]) (chemisch rein) in 2000 *cm*³ Wasser löst, diese Lösung sterilisiert und mit einer genügenden Menge von Chloroform versetzt. Für jedes Rohr läßt man 200 *cm*³ monokalziumphosphathaltiges Wasser 30 Tage lang mit der gleichen Geschwindigkeit durchsickern. In 200 *cm*³ Monokalziumphosphatlösung sind 1·42 *g* P_2O_5 vorhanden. Nach 30 Tagen wird der Inhalt der Glas-

[1]) $^1/_{10}$ Molekulargewicht des chemisch reinen Monokalziumphosphates.

röhren mit dem gleichen Quantum destillierten Wassers durchgewaschen, damit das Filtrat mit dem Waschwasser von jedem einzelnen Rohr 500 *cm*³ beträgt. In dem abgemessenen Quantum der Flüssigkeit wird das Phosphorsäureanhydrid mittelst der Molybdänmethode bestimmt. Ich lasse hier einige Beispiele folgen. Die Resultate der folgenden Versuche sind auf 250 *g* Trockensubstanz der betreffenden Böden berechnet.

A. Versuche mit Böden, welche einen sauren Charakter besitzen.

1. Ehemaliger Waldboden von Kundratitz.

Dies ist ein Boden, der reich an Humuskolloiden ist und einen sauren Charakter besitzt.

Nach 30 Tagen wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid in den sterilisierten Röhren 48·8%, in den unsterilisierten Röhren 52·6% absorbiert.

2. Ein Torfboden von Milčic, welcher reich an Humusstoffen war und einen sauren Charakter besaß.

Nach 30 Tagen wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid in den sterilisierten Röhren 63·7%, in den unsterilisierten Röhren 68·3% absorbiert.

B. Versuche mit Böden, die einen schwach alkalischen oder neutralen Charakter besitzen.

1. Angeschwemmter Boden von Sadska. Dieser Boden besaß einen schwach alkalischen Charakter, zeichnete sich durch eine große Fruchtbarkeit aus und war ein vorzüglicher Gerstenboden.

Nach 30 Tagen wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid in den sterilisierten Röhren 80·8%, in den unsterilisierten Röhren 94·6% absorbiert.

2. Angeschwemmter Boden von Kouřim. Dieser Boden wies einen neutralen Charakter auf und war ein ausgezeichneter Rübenboden.

Nach 30 Tagen wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid in den sterilisierten Röhren 86·3%, in den unsterilisierten Röhren 98·5% absorbiert.

3. Rübenboden von Böhmischbrod. Dieser Boden besaß einen schwach alkalischen Charakter und war äußerst fruchtbar.

Nach 30 Tagen wurden vom Gesamtphosphorsäureanhydrid in den sterilisierten Röhren 85·3%, in den unsterilisierten Röhren 99·8% absorbiert.

Die Differenz in der Menge des absorbierten Phosphorsäureanhydrids bei den sterilisierten Böden gegenüber den nichtsterilisierten wird durch die Assimilation der im Boden vorhandenen Mikroorganismen hervorgerufen. Diese durch die biologische Absorption entstehende Differenz beträgt bei dem Waldboden von Kundratitz 3·8%, bei dem Torfboden von Milčic 4·6%, bei dem angeschwemmten Boden von Sadska 13·8%, bei dem angeschwemmten Boden von Kouřim 12·2% und bei dem Rübenboden von Böhmischbrod 14·5% P_2O_5. Die Böden, welche einen sauren Charakter haben, also die absorptiv ungesättigten und weniger fruchtbaren Böden, kennzeichnen sich durch ein kleines biologisches Absorptionsvermögen, die absorptiv gesättigten Böden hingegen weisen für das Phosphat-Ion ein großes Absorptionsvermögen auf. Die

Assimilation des Phosphat-Ions steigt, wenn alle Vegetationsfaktoren für die Entwicklung der Mikroben im Boden vorhanden sind, das ist namentlich eine große Luftkapazität, die Anwesenheit leicht zersetzbarer Kohlenhydrate und genügender Mengen Stickstoffs in leicht assimilierbarer Form.

Versuche über die biologische Absorption des Kali-Ions.

Diese Versuche wurden ebenso wie die Experimente bezüglich der biologischen Absorption des Phosphations ausgeführt, jedoch hierzu Kaliumchlorid sowie Kaliumsulfat verwendet.

Wir fanden auch hier wieder, daß diejenigen Böden, welche einen sauren Charakter besitzen, also die absorptiv ungesättigten und weniger fruchtbaren Böden, ein kleines biologisches Absorptionsvermögen, die absorptiv gesättigten Böden hingegen ein großes Absorptionsvermögen für das Kali-Ion aufweisen.

Biologische Absorption des Nitrat- und Ammoniumions.

Diese Versuche wurden genau so vorgenommen, wie die früher geschilderten, nur benutzte man dazu Ammonium-, Natrium- oder Calciumnitrat und Ammoniumsulfat. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei den Experimenten betreffs der biologischen Absorption des Phosphations. Die von uns erhaltenen Resultate sind sehr interessant, denn, es ergab sich, daß diejenigen Böden, die eine kleine Luftkapazität besitzen arm an Bakterien und abbaufähigen organischen Substanzen waren, ein viel kleineres biologisches Absorptionsvermögen für das Ammonium- und Nitration besaßen als jene Böden, welche reich an Bakterien und abbaufähigen organischen Substanzen sind. Ferner wurde festgestellt, daß die biologische Absorption des Nitrat- und Ammoniumions von der Anwesenheit des Phosphat- und Kaliions abhängig ist.

Bestimmung der Katalase im Boden.

Die Katalasen sind im Tier- und Pflanzenreich sehr stark verbreitet. Sehr kräftige Katalasen erhält man aus Hutpilzen (Boletus scaber) und aus niederen Pilzen, Hefen und Bakterien.[1])

August Jorns[2]) bestimmte die Katalase in den Bakterien in der Weise, daß er eine abgemessene Menge der auf ihren Katalasegehalt zu untersuchenden Flüssigkeit (Bouillonkultur etc.), z. B. 1 cm^3 mit Wasser verdünnte (meist auf 90 cm^3), nachdem vorher ermittelt war, wieviel Kubikzentimeter $\frac{1}{100}$ n-$KMnO_4$-Lösung von dem in der Flüssigkeit vorhandenen Eiweiß reduziert werden. Dann wurden abgemessene Mengen H_2O_2 (meist 10 cm^3 einer ca. 1%igen Lösung) zugesetzt. Die Flüssigkeiten wurden in einer 200 cm^3-Flasche mit eingeschliffenem Stöpsel zusammengebracht. Der Augenblick, in dem der Zusatz der H_2O_2-Lösung geschah, galt

[1]) *Hans Euler,* Allgemeine Chemie der Enzyme. Wiesbaden 1910.

[2]) *August Jorns,* Über Bakterienkatalase. Arch. f. Hyg. **67**. 134—62. Chem. Zentralblatt. Bd. **79**. II. 1908.

als Anfang der Reaktion. Nach der gewünschten Zeit wurde das unzersetzt gebliebene H_2O_2 in schwefelsaurer Lösung mit $KMnO_4$-Lösung zurücktitriert. Die $KMnO_4$-Methode der quantitativen H_2O_2-Bestimmung in Flüssigkeiten, die geringe Mengen von Bakterienbouillonkulturen und deren Filtraten, d. h. von organischer Substanz enthalten, hat vor der jodometrischen Methode den Vorzug größerer Genauigkeit und schnellerer Ausführung; die gasanalytische Methode arbeitet ebenfalls genau, ist aber zeitraubend.

Alle Versuche von *August Jorns* liefern den Beweis, daß die Eigenschaft der H_2O_2-Zersetzung unter Entwicklung von freiem Sauerstoff durch Bouillonkulturen auf der Wirksamkeit eines spezifischen, von den Bakterien gebildeten Fermentes beruht. Die Bakterienkatalase tritt als Ekto- und Endokatalase auf. An Prodigiosuskulturen wurde gezeigt, daß die Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd zu zersetzen, noch vorhanden ist, wenn die Bakterienzellen bereits zerstört sind; auch die keimfreien Filtrate wirkten noch auf Wasserstoffsuperoxyd. Die Katalasebildung ist eine fast allgemein verbreitete Fähigkeit der Bakterien, die allerdings quantitativ bei den einzelnen Arten sehr ungleich ist.

Arthur W. Dox[1] hat die Katalase in Schimmelpilzen konstatiert. Er fand, daß die Schimmelpilze ebenfalls eine stark aktive Katalase enthalten. Die Katalasemenge in den Schimmelpilzen wurde volumetrisch durch Auffangen des aus 5 cm^3 einer 3·81%igen Wasserstoffsuperoxydlösung in 3 Minuten abgespaltenen Sauerstoffes bestimmt. Das Verhalten von Katalase in verschiedenen Schimmelpilzarten zeigt folgende Tabelle:

		cm^3 Sauerstoff in 3 Min.			cm^3 Sauerstoff in 3 Min.
Penicillium	duclauxi	25·3	Penicillium	claviforme	0·3
„	biforme	25·0	„	pinophilum	0·2
„	spinulosum	22·4	„	luteum	0·2
„	decumbens	17·4	„	roqueforti	0·2
„	camemberti	13·7	„	granulatum	0·1
„	italium	11·1	Aspergillus	glaucus	21·1
„	chrysogenum	10·0	„	fumigatus	19·6
„	stoloniferum	8·6	„	clavatus	13·2
„	intricatum	5·2	„	nidulans	10·1
„	atramentoum	3·5	„	varians	7·4
„	lilacinum	2·8	„	flavus	6·5
„	citrinum	2·6	„	ostianus	4·5
„	expansum	2·0	„	ochraceus	3·9
„	divaricatum	1·2	„	oryzae	2·4
„	rugulosum	0·9	„	candidus	1·2
„	roseum	0·8	„	wentii	0·6
„	africanum	0·8	„	niger	0·0

Was die physiologische Funktion der Katalase in der lebenden Zelle anbelangt, so ist es nach dem jetzigen Stand der Wissenschaft und Forschun-

[1] *Arthur W. Dox*, Journ. Americ. Chem. Soc. 32, 1357—61. Chem. Zentralblatt Bd. 81. II. 1910.

gen von *Ewald*, *Italie*, *Chodat* und *Neuhaus*, *Kastle* und *Loewenhart*, *Leo Liebermann*, *Euler* und *Oskar Loew* sehr schwer, sich von der Bedeutung des Enzyms im Stoffwechsel der Zelle eine Vorstellung zu machen. Daß die Katalase gar keine lebenswichtige Rolle spielen sollte, ist in Anbetracht ihrer ubiquitären Verbreitung in allen Zellen[1]) unwahrscheinlich. Nachdem die Bakterien und Schimmelpilze die Eigenschaft besitzen, Wasserstoffsuperoxyd mit großer Energie zu zersetzen, kann man voraussichtlich durch die Katalasebestimmung im Boden einen gewissen Anhaltspunkt gewinnen über die Verbreitung und Menge der wirkenden Enzyme der Bakterien und Schimmelpilze im Boden. Durch Zusatz von Chloroform wird die Sauerstoffentwicklung sehr wesentlich herabgedrückt, durch Zusatz von Blausäure bei vielen Böden fast ganz aufgehoben.

Methodik der Katalasebestimmung.

Nach *Löhnis*[2]) zersetzt ähnlich wie die Milch auch die Erde Wasserstoffsuperoxyd; die abgespaltenen Sauerstoffmengen sind nach seiner Ansicht in diesem Falle aber weit größer als in jenem. Humus, Mikroorganismen und anorganische Bodenbestandteile beteiligen sich gemeinsam an dem Prozeß. In der Regel genügt es, 5 *g* Erde mit 20 cm^3 3%igem Wasserstoffsuperoxyd (1 Teil Perhydrol Merck + 9 Teile destilliertes Wasser) zu versetzen; sehr humusreichen Böden (Schwarzerden) muß dagegen 40 cm^3 hinzugefügt werden, wenn die volle Sauerstoffentwicklung beobachtet werden soll. Für Vergleichszwecke scheint es nach *Löhnis* am zweckmäßigsten zu sein, festzustellen, innerhalb welcher Zeit die ersten 100 cm^3 Sauerstoff in Freiheit gesetzt werden. Die im 300 cm^3-Erlenmeyerkolben befindliche Erde wird zweckmäßig vor Zugabe des Wasserstoffsuperoxyds in 50 cm^3 Wasser aufgeschwemmt, das Gemisch während der Beobachtungszeit in Bewegung gehalten und das Gas in einem graduierten Rohr über Wasser aufgefangen. Experimentiert man mit derselben Erde 1. in frischem Zustande, 2. nach erfolgter Abtötung der Mikroorganismen und Zerstörung von deren Katalase durch Behandlung der Erde im Autoklaven bei 2 Atm. Überdruck und 3. nach Zerstörung der Humussubstanzen durch Glühen des Bodens, so erhält man ein ungefähres Urteil über die Beteiligung der drei genannten Faktoren am Resultat.

Wir benutzten zur Bestimmung der Katalase mit großem Vorteil den Apparat von *Henkel*. Dieser besteht aus einem Topf, der mit Wasser von 22° C gefüllt wird. In dem Glasrohr ohne Teilung der Gasentwicklungsröhre wird 1 *g* Boden mit 5 cm^3 sterilisierten Wassers und 8 cm^3 3%igen Wasserstoffsuperoxyds (1 Teil Perhydrol von Merck + 9 Teile destillierten Wassers) untereinander vermischt; sofort wird auf die Glasröhre ein Gummistopfen aufgesetzt, in dessen Bohrung ein S-förmig gebogenes Glasrohr, das Gasableitungsrohr, eingesteckt ist.

[1]) Näheres über die Katalase finden die Leser in dem vorzüglichen Werk: „Die Fermente und ihre Wirkungen" von *Carl Oppenheimer*. Leipzig 1910.

[2]) Dr. *F. Löhnis*, Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum. Verlag von Gebrüder Borntraeger. Berlin 1911.

Zwischen Stopfen und dem Gemisch soll noch ein Abstand von $1^1/_2$—2 *cm* sein. Der Abstand darf nicht zu klein sein, weil sonst bei der Gasentwicklung Schaum in das S-Rohr gelangt.

Das so verschlossene Röhrchen mit Boden setzt man nun in den drehbaren Einsatz. In dem Topf muß so viel Wasser sein, daß die untere Öffnung des S-Rohres 2 *cm* unter Wasser steht und das Wasser bis an den Stopfen des Rohres mit Boden reicht.

Das mit Teilung versehene Röhrchen (Gasauffangröhre) füllt man an der Ausbuchtungsstelle des Topfes durch Untertauchen vollständig mit Wasser, kehrt es unter Wasser um, so daß die Öffnung nach unten ragt, bringt nun, immer unter Wasser, die Öffnung des Röhrchens mit Teilung über die Öffnung des S-Rohres und drückt es oben in die am drehbaren Einsatz befindliche Klammer, über welcher eine Nummer angebracht ist. Wenn dies richtig gemacht wird, ist das Gasauffangrohr ganz mit Wasser gefüllt. Es darf sich unmittelbar nach dem Aufsetzen am oberen Ende keine Luftblase befinden.

Das Aufsetzen des Stöpsels, das Einsetzen in das Wasserbad und das Überstülpen der Gasauffangröhre muß rasch geschehen, da bei den meisten Bodenproben die Gasbildung sehr rasch eintritt.

Durch das in dem Boden vorhandene Enzym, „Katalase" genannt, oder durch ähnliche Enzyme wird aus dem Wasserstoffsuperoxyd Sauerstoffgas ausgeschieden. Dieses steigt durch die S-Röhre in das überstülpte Rohr und verdrängt Wasser, so daß nun in der Röhre über der Wassersäule eine je nach der Menge der Katalase verschieden hohe Gassäule steht. Diese Gasmenge wird nach Verlauf von 2 Stunden gemessen. Man zählt von oben nach unten die Striche ab; ein Teilstrich bedeutet 1 cm^3 Gas. Kleinere Mengen schätzt man.

Man kann sich auch eines Apparates bedienen, welcher an der Vorderseite der Ausbuchtung eine Glasscheibe besitzt. Bei der Ablesung faßt man dann das Gasauffangröhrchen mit einer Klemme (damit sich das Gas durch die Berührung mit der Hand nicht ausdehnt), hebt dasselbe von dem S-Rohr ab, bringt es, die Mündung immer unter Wasser, vor die Glasscheibe und taucht es senkrecht so weit ein, daß das Wasser innen und außen gleich hoch steht. So kann man bei gleichem Innen- und Außendruck ablesen.

Man kann die Ablesung dieser Art auch außerhalb des Wasserbades vornehmen, indem man den beigegebenen Becher mit Stiel unter Wasser bringt und die Mündung des Gasauffangrohres in den Becher aufrecht einstellt. So kann dann das Röhrchen in ein Glasgefäß mit Wasser (Becherglas, Zylinder u. dgl.) übertragen werden und dort die Ablesung bei gleichem Innen- und Außendruck erfolgen.

Ich lasse hier die Resultate, welche wir mit diesem Apparat erhalten haben, in der nachstehenden Tabelle I folgen. Unsere Untersuchungen wurden an zwei fruchtbaren Lehmböden und an einem Verwitterungsboden, welcher noch nie bebaut wurde, vorgenommen. Wie aus der Tabelle I deutlich ersichtlich ist, sind zwischen dem bebauten und unbebauten Boden große Differenzen wahrzunehmen.

Tabelle I.

Art der Böden	In frischem Zustande. Durchschnittszahl aus 3 Versuchen, umgerechnet auf Trockensubstanz			Sterilisiert bei 2 Atm. im Autoklav. Durchschnittszahl aus 3 Versuchen, umgerechnet auf Trockensubstanz		
	In 1 Stunde	In 2 Stunden	In 3 Stunden	In 1 Stunde	In 2 Stunden	In 3 Stunden
Ein fruchtbarer Ackerboden . .	28·0 *cm*³ O	33·1 *cm*³ O	38·7 *cm*³ O	3·0 *cm*³ O	4·5 *cm*³ O	5·7 *cm*³ O
Ein anderer fruchtbarer Ackerboden	30·4 *cm*³ O	35·3 *cm*³ O	42·6 *cm*³ O	3·0 *cm*³ O	4·2 *cm*³ O	5·2 *cm*³ O
Ein noch nie bebauter Boden . .	5·1 *cm*³ O	6·9 *cm*³ O	8·5 *cm*³ O	1·4 *cm*³ O	2·3 *cm*³ O	3·0 *cm*³ O

Art der Böden	Ausgeglüht. Durchschnittszahl aus 3 Versuchen, umgerechnet auf Trockensubstanz			
	In 1 Stunde	In 2 Stunden	In 3 Stunden	
Ein fruchtbarer Ackerboden . .	2·4 *cm*³ O	3·8 *cm*³ O	5·5 *cm*³ O	
Ein anderer fruchtbarer Ackerboden	6·6 *cm*³ O	10·3 *cm*³ O	13·5 *cm*³ O	Die größere Menge des abgespaltenen Sauerstoffs bei diesem ausgeglühten Boden im Vergleiche zu der in demselben sterilisierten Boden ließe sich vielleicht durch die Wirkung der Mineralsubstanz erklären
Ein noch nie bebauter Boden . .	0·6 *cm*³ O	0·9 *cm*³ O	1·1 *cm*³ O	

Über die Bestimmung der katalytischen Kraft des Ackerbodens hat des weiteren auch *J. König*[1]) Versuche angestellt. Derselbe beschreibt in der betreffenden Arbeit auch einen Apparat zur Bestimmung der katalytischen Kraft des Bodens, welcher im Prinzip derselbe ist, wie ich ihn oben beschrieben habe.

Dieser Forscher fand, daß die Sauerstoffentbindung aus Wasserstoffsuperoxyd oder die katalytische Kraft des Bodens im allgemeinen mit seinem Gehalt an Humus bezw. organischen Stoffen steigt und fällt. Daß die Sauerstoffentbindung nach Zusatz von Chloroform und Blausäure nicht bei allen Böden ganz aufgehört hat, hat seinen Grund darin, daß außer Enzymen im Boden noch andere Sauerstoff entbindende Stoffe, wie Mangan- und Eisenoxyde vorkommen. Kocht man die Böden mit Salzsäure aus, so hat der Bodenrückstand die Fähigkeit, Sauerstoff aus Wasserstoffsuperoxyd zu entwickeln, vollständig verloren.

Zum Schlusse will ich noch erwähnen, daß für die Messung der katalytischen Kraft des Bodens auch der Apparat von *Liebermann* (siehe *Abderhaldens* Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, III. Bd., 1. Hälfte, S. 69) mit Vorteil benutzt werden kann.

[1]) *J. König*, Die Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. Berlin 1911.

Methodik der Stoffwechseluntersuchung bei Mikroorganismen.

Von **Hans Pringsheim**, Berlin.

Einleitung.

Die Stoffwechseluntersuchung der Mikroorganismen bildet einen wichtigen Zweig der Physiologie pflanzlicher Lebewesen. In botanischen Instituten herrscht im allgemeinen eine große Vertrautheit mit der Isolierung und Kultivierung der Kleinlebewesen, während sich der Nachweis der Stoffwechselprodukte häufig auf chemisch wenig scharf präzisierte Methoden beschränkt. Nicht selten sind daher Irrtümer oder zum mindesten wenig übereinstimmende Resultate die Folge mangelnder chemischer Ausbildung gewesen. In chemischen Laboratorien andrerseits wird der Mangel an Vertrautheit mit den bakteriologischen Methoden der Kultivierung niederer Organismen, wie man sie schlechthin wohl bezeichnen darf, nicht selten als ein Hemmnisgrund für derartige Versuche angesehen. Da aber Mikroorganismen sehr häufig chemisch eindeutige Umsetzungen vollziehen, die auch wegen ihrer Analogie zum Stoffwechsel höherer Organismen großes Interesse beanspruchen, da weiterhin niedere Organismen häufig gerade in die wichtige Erforschung tierischer und pflanzlicher Produkte hineingezogen werden müssen, so dürfte auch für den Chemiker eine Anleitung zur Methodik der Versuchsanstellung in dieser Richtung von Wert sein. Er kann so leicht dazu gebracht werden, eine gewisse Scheu vor dem Unbekannten zu überwinden und an Aufgaben heranzugehen, die ihn sonst schrecken würden.

Der Zweck der hier beabsichtigten Darstellung ist demnach rein praktischer Natur. Nicht nur die Raumbeschränkung, sondern auch dieses Gebot empfiehlt es deshalb, aus dem großen Gebiete der chemischen Mikrobiologie nur scharf präzisierte und möglichst einheitliche Umsetzungen auszuwählen, in der Hoffnung, daß an der Hand einer derartigen Anleitung auch kompliziertere und weniger erforschte Fragestellungen in Angriff genommen werden können, nachdem einmal ein praktischer Leitfaden für die Versuchsanstellung gegeben ist.

Umgrenzung des Begriffes „Mikroorganismen".

Den systematischen Botaniker wird von vornherein die Umgrenzung des Begriffes „Mikroorganismen" schrecken. Denn selbst die Definition, daß es sich hier um Kleinlebewesen handelt, die sich hauptsächlich durch asexuelle Teilung vermehren, ist wenig befriedigend. Für unsere Zwecke ist die Beschränkung aber verhältnismäßig einfach. Sie ist zuerst gegeben durch die Bedingung der Reinkultur, die in jeder Richtung hin eine der Hauptforderungen einer präzisen Mikroorganismen-Forschung sein muß. Da diese bisher nun mit Sicherheit und einer für unsere Ziele erforderlichen Leichtigkeit nur bei Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen, wenigen Algen Flagellaten und Volvocineen gelungen ist, so wird unsere Aufgabe schon durch diese Beschränkung erleichtert. Dazu kommt, daß die zuerst genannten Klassen von Mikroorganismen auf eine besonders spezifische Ernährungsphysiologie und demnach einen sehr speziellen Stoffumsatz eingestellt sind, dessen Spezifizität uns vom chemischen Standpunkte aus am meisten interessiert. Die Protozoen dagegen verhalten sich ernährungsphysiologisch, so weit bekannt, weniger eindeutig, wie schon aus der Tatsache hervorgeht, daß sie zum Teil wenigstens geformte Nahrung aufnehmen. Sie sind weiterhin schwer zu isolieren und noch schwerer zu kultivieren. Die Erforschung ihres Stoffwechsels liegt aus diesen Gründen noch sehr im argen. Hier liegt mehr eine reizvolle Aufgabe der Zukunft, als eine Möglichkeit der Besprechung ausgearbeiteter Methoden in der Gegenwart vor.

Unter den grünen Mikroorganismen, die mit einem Chlorophyllapparat ausgerüstet sind, gibt es zahlreiche, die sich mixotroph ernähren können, die also auch organische Kohlenstoffquellen ausnutzen. Die Frage, in welcher Weise durch diesen Wechsel in der Ernährung ihr sonstiger Stoffwechsel beeinflußt wird, ist sehr interessant. Sie ist jedoch nach dem jetzigen Stande unserer Erkenntnis gar nicht zu beantworten.

Die Verwendung von Reinkulturen. Ihr Vorzug und ihr Mangel.

Wenn wir als eine der Hauptforderungen für die Stoffwechseluntersuchungen bei Mikroorganismen die Verwendung von Reinkulturen deklariert haben, so geschah das deshalb, weil wir nur mit ihnen zu einheitlichen und vergleichbaren Resultaten gelangen können. Denn Versuche mit unentwirrbaren Mischkulturen können naturgemäß durch die eine oder andere schwer zu kontrollierende und häufig von feinsten Unterschieden abhängende Differenz der Mikroorganismenflora in sehr verschiedener und unerwarteter Richtung verlaufen. Die Reinkultur entspricht dem Individuum bei größeren Organismen. Die Umsetzungen durch ein einzelnes Kleinlebewesen sind quantitativ zu gering, daher müssen viele gleichzeitig in Reaktion treten. Sie müssen aber möglichst gleichartig sein. Die Forderung „Reinkultur" erwächst daher aus rein praktischen Gründen. Sie ist in anderer Beziehung durchaus keine ideale. Denn es ist klar, daß gerade unter natürlichen Verhältnissen, die uns ja besonders interessieren müssen, durch das Ineinandergreifen verschiedener mikrobiologischer Pro-

zesse, bedingt durch das Zusammenwirken verschiedenartiger Lebewesen, ganz andere Resultate zustande kommen können, als in unseren Reinkulturversuchen. Besonders wird eine Fortschaffung von Stoffwechselprodukten einer Mikroorganismenspezies durch eine andere häufig gesteigertes Wachstum und vermehrte Umsatzkraft zur Folge haben. Auch gegenseitige Hemmungen sind auf dieselbe Weise wohl möglich. Sie werden aber in die natürlichen Verhältnisse weniger hineinspielen, da hier ein Zusammengedeihen antagonistischer Kleinlebewesen durch eine natürliche Auslese hintangehalten werden dürfte.

Um einen Einblick in natürliche Stoffumsatz-Möglichkeiten zu gewinnen, wird es sich empfehlen, zur Erreichung gewisser Zwecke Reinkulturen zu kombinieren und auf der Basis einer noch kontrollierbaren Mikroorganismenmischung Stoffwechselversuche anzustellen.[1]) Bei derartigen Versuchen, die bisher wenig zahlreich gewesen zu sein scheinen, merkt man jedoch sehr bald, wie schwierig es ist, die Natur in dieser Richtung nachzuahmen. Denn meist gelingt die Lösung der gestellten Aufgabe dadurch nicht, daß nur eine der eingesähten Kulturen, oder wenn die Bedingungen so gestellt sind, daß nur beide zusammenwirkend wachsen können, gar keine zur Entwicklung kommt.

Außer den geschilderten Nachteilen der Reinkultur sind aber noch andere zu erwähnen. Die Zucht im Laboratorium zieht häufig eine Degeneration oder auch eine Anpassung nach sich, welche dem Verhalten frisch isolierter Mikroorganismen nicht entspricht.[2]) Auch dadurch kann also eine Divergenz zwischen den Resultaten verschiedener Forscher zustandekommen. Überhaupt vergesse man nicht, und das sei speziell dem gegen die Exaktheit biochemischer Forschung bisweilen etwas vorurteilsvollen Chemiker gesagt, daß es sich hier nicht um unbelebte Substanzen konstanten Verhaltens, sondern um sehr veränderliche Lebewesen handelt, deren Verhalten man genau kennen muß, ehe man gegen ihre spezifischen Funktionen ins Feld zieht.

Beschaffung von Kulturen.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß man am besten mit frisch isolierten Kulturen arbeitet, deren Konstanz in physiologischer Hinsicht man dann noch scharf überwachen muß. Anleitungen zur Isolierung verschiedenartiger Mikroorganismen sind im Folgenden gegeben. Häufig kann die obige Forderung nicht erfüllt werden. Hat man keine andere Gelegenheit, so kann man sich viele Reinkulturen aus dem bakteriologischen Laboratorium

[1]) Vgl. hierzu *H. Pringsheim*, Über die Verwendung von Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **23** (1909). S. 300; Bd. **26** (1910). S. 221. — *H.* und *E. Pringsheim*, Über die Verwendung von Agar-Agar als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. Ebenda. Bd **26** (1910). S. 227.

[2]) Vgl. hierzu *H. Pringsheim*, Die Variabilität niederer Organismen. Eine deszendenz-theoretische Studie. Berlin. Julius Springer. 1910.

von *Král*, Prag, I., Kleiner Ring 11 (Preis pro Kulturröhrchen 6 K ohne Verpackung und Porto).[1] gärungsphysiologisch wichtige Hefen und Schimmelpilze aus dem Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N., Seestraße, kommen lassen. An letzterer Stelle sind auch größere Mengen von Hefe, eventuell Reinkulturhefe, zu haben. Schwer zugängliche Kulturen von Schimmelpilzen und einigen Algen kann man auch in der Zentrale für Pilzkulturen der Association Internationale des Botanistes, Frl. Dr. *Westerdyk*, Roemerslaat 1, Amsterdam, erhalten. Doch sind die Preise für die Nichtmitglieder ziemlich hohe, 3 fl. (holl.) pro Kultur. Im Austausch erhält man Kulturen auch umsonst.

Einfluß des Säure- und Alkaligrades, wie der Konzentration im allgemeinen.

Naturgemäß können Mikroorganismen nur in Lösungen gedeihen, die fast neutral sind. Dabei ist zu beachten, daß Hefen und Schimmelpilze (auch Euglenen) im allgemeinen schwach saure, Bakterien und Algen dagegen schwach alkalische Nährböden bevorzugen. Um einem Nährboden diese Reaktion zu verleihen, genügt es meistens, daß man seinen Kalium- und Phosphorsäurebedarf je nach Bedürfnis durch Monokaliumphosphat (KH_2PO_4) für saure oder mit Dikaliumphosphat (K_2HPO_4) für alkalische Nährböden deckt. Von diesen Salzen verwendet man im allgemeinen, wie aus den folgenden Angaben über das Nährsalzbedürfnis ersichtlich, 0·05%. Hefen- und Schimmelpilzkulturen kann man gegen die Verunreinigung mit Bakterien, die wegen der Sporenresistenz am meisten zu befürchten ist, durch schwachen Säuregrad schützen. Hierzu empfiehlt sich am besten ein Zusatz von Weinsäure bis zur deutlich sauren Reaktion gegen Lackmus. Auch Zitronensäure ist verwendbar. Dagegen sind Fettsäuren, wie Essig- oder Buttersäure, in höherem Maße noch Ameisensäure wegen ihrer hemmenden Wirkung zu verwerfen.

Soll eine stark saure Flüssigkeit der Zersetzung durch Mikroorganismen unterworfen werden, so muß man die Säure durch Soda abstumpfen. Der Zusatz eines Überschusses von Natriumazetat, an das man zur Entfernung der Reaktion starker Säuren denken könnte, weil man die in Freiheit gesetzte Essigsäure durch Abdampfen entfernen kann, wirkt schon stark hindernd auf die Mikroorganismenentwicklung, besonders auf die Gärung. Kochsalz, Natriumnitrat und Natriumsulfat sind im allgemeinen keine Hemmungsfaktoren.

Verunreinigungen durch Schimmelpilze sind wegen der Oberflächenmyzelentwicklung — alle Schimmelpilze sind sauerstoffbedürftig — schon makroskopisch leicht zu erkennen. Reine Hefen und Schimmelpilzkulturen sind für gewöhnlich klar. Bakterielle Verunreinigungen werden durch Trübungen opaleszierender Natur sichtbar. Doch kann eine Trübung z. B. bei der Verwendung von Preßhefe auch durch Mykodermen veranlaßt werden. Die mikroskopische Nachprüfung kann natürlich auf diese Fragen

[1]) Seitdem dies geschrieben wurde, ist die *Král*sche Sammlung nach dem Tode *Králs* verkauft worden. Sie wird von Prof. *E. Kraus* und Doz. *E. Přibram*, unter dem Namen Králs Bakteriologisches Museum, Wien, IX 3, Zimmermanngasse 3, fortgeführt.

die einzig eindeutige Antwort geben. Die angegebenen mikroskopischen Beobachtungen sind in dieser Hinsicht nur Fingerzeige! Gleichartige Verunreinigungen sind nur durch mikroskopische oder biologische Analyse — Plattenguß — nachzuweisen.

Der Hemmung des Fortganges einer Zersetzung durch saure Stoffwechselprodukte kann man z. B. bei der Buttersäuregärung oder der Zellulosevergärung durch Zusatz von kohlensaurem Kalk vorbeugen. Der Ersatz des Kalziumkarbonats durch Baryumkarbonat, der wegen der leichten quantitativen Entfernung des Baryts mit Schwefelsäure für die Weiterverarbeitung häufig wünschenswert erscheint, läßt sich nicht immer durchführen. Baryumsalze sind Gifte, die meist, wenn auch nicht direkt hemmend, so doch verzögernd wirken. Um den Kalk zu entfernen, bestimmt man in einem aliquoten Teil der Flüssigkeit den Kalkgehalt und setzt dem vom Kalk zu befreienden Rest dann die entsprechende Menge Schwefelsäure zu. Durch Alkohol kann man den Gips dann zur quantitativen Ausfällung bringen. Häufig genügt es aber schon, die Hauptmenge der lästigen Salze durch Alkohol auszufällen. Der zunehmenden Alkalisierung der Nährflüssigkeit, z. B. bei der Denitrifikation, ist schwerer vorzubeugen. Der Zusatz von Weinstein oder Harnsäure, die unter dem Einflusse des gebildeten Alkalis in Lösung gehen, ist meist wegen der unerwünschten und die Resultate verschleiernden Zuführung organischer, bei der Harnsäure sogar stickstoffhaltiger Substanz, unmöglich. Was der Torf hier leisten kann, der Alkalien adsorbiert, ist noch nicht ausgeprobt. Er wirkt überdies häufig antiseptisch. Man beachte, daß bei Verwendung von schwefelsaurem Ammoniak als Stickstoffquelle eine zunehmende Versäuerung des Nährbodens Platz greift, während mit Salpeter alkalische Reaktion einsetzt. Darauf beruht häufig die schlechte Ausnutzung letzterer Stickstoffnahrung bei Hefen und Schimmelpilzen. Salpetrige Säure ist bei saurer Reaktion ausgesprochen giftig, bei alkalischer oder neutraler aber weit ungefährlicher.

Einen Einblick in all diese Verhältnisse gestattet das Studium der Arbeiten des Meisters der Elektivkultur *M. W. Beijerinck*. Eine gute Auswahl gab *Stockhausen*, Ökologie, „Anhäufungen" nach *Beijerinck*, Berlin 1907, Institut für Gärungsgewerbe.

Vor allem muß bei Stoffwechselversuchen mit Mikroorganismen beachtet werden, daß die Umsatzmöglichkeit in hohem Maße vom Konzentrationsgrad abhängig ist. Denn in einem gewissen Flüssigkeitsvolumen kann sich immer nur eine beschränkte Anzahl von Organismen entwickeln, die den Umsatz vollziehen müssen, ehe durch Produkte ihres eigenen Stoffumsatzes Hemmung eintritt. Zu hohe Konzentration irgend eines Zusatzes kann auch direkt das Wachstum hemmen. Die Gründe für die Maximalentwicklung von Mikroorganismen in einem bestimmten Nährlösungsvolumen sind keineswegs immer klar; denn auch die Entfernung der Stoffwechselprodukte durch den Ersatz der alten durch neue Nährlösung gestattet meist keine weitere Entwicklung über das Maximalwachstum in einem bestimmten Volumen hinaus. Jedenfalls muß mit diesem Faktor gerechnet werden. Sehen wir von Gärprozessen

und anderen energieliefernden Umsetzungen ab, so wird der mögliche Umsatz durch das Nahrungsbedürfnis geregelt, das für die Kohlenstoffquelle immer größer als für die Stickstoffquelle ist. Allgemeine Regeln lassen sich hier zwar nicht aufstellen. Man kann aber sagen, daß die Zersetzung der Kohlenstoffnahrung für gewöhnlich bis zu 0·5%, die der Stickstoffnahrung bis zu 0·1% und weniger gelingt. Weit höher sind die Umsatzmöglichkeiten bei Gärprozessen, die neben dem Aufbau der Körpersubstanz und unabhängig von demselben als energieliefernde Prozesse einherlaufen. So kann Hefe noch 15%ige Zuckerlösungen völlig vergären, während bei der Buttersäure-, Milchsäure- und anderen Gärungen wie bei der Oxydation des Alkohols zu Essigsäure geringere Konzentrationen für einen völligen Umsatz erforderlich sind.

Auch die Zeit ist hier ein wichtiger Faktor. Meist wird ein gewisses Maximum der Umsetzung verhältnismäßig schnell erreicht. Dann findet ein Abfall statt, und das Ende der Reaktion, der völlige Umsatz, kann häufig erst nach langer Dauer, nach Wochen, ja Monaten erreichbar sein. Dabei versteht sich von selbst, daß man möglichst bei optimaler Temperatur arbeitet, die ganz von der Art der speziellen Organismen abhängig ist.

Aufbewahren der Kulturen.

Eine größere Anzahl von Kulturen lebend zu erhalten, macht keine geringe Mühe. Sporenhaltiges Material kann man eintrocknen lassen; es ist dann meist jahrelang haltbar. Hefen sollen sich nach den Angaben von *E. Ch. Hansen* in 10%iger reiner Zuckerlösung, ohne Salze und Stickstoffquelle, ebenfalls jahrelang am Leben erhalten. Alle anderen Kulturen müssen umgeimpft werden und man muß sie vor Austrocknen schützen, etwa dadurch, daß man sie unter Glasglocken bringt. An Stelle der im großen Maßstabe etwas langwieriger zu bereitenden Agarröhrchen kann man häufig mit Vorteil die Kultur auf Möhren- oder Kartoffelstücken benutzen. Doch beachte man, daß solche Naturprodukte schwierig zu sterilisieren sind. Man lasse die mit ihnen beschickten Röhrchen daher zur Kontrolle einige Zeit stehen, ehe man sie mit Reinkulturen beimpft. Dem Bedürfnis eines schnellen Umimpfens kann man dadurch in gewissem Grade vorbeugen, daß man nach dem Anwachsen die Kulturen bei niederer Temperatur aufstellt. Sie führen dann ein mehr latentes Dasein. Vor der Entnahme ist am besten neu zu inkubieren! Auch Zuschmelzen der Kulturröhrchen, besonders wenn es zu Zeiten voller Entwicklung geschieht, wirkt häufig lebensverlängernd. Einfacher kommt man noch zum Ziele, wenn man die Röhrchen mit dem Wattepfropf in geschmolzenes Paraffin eintaucht und das Paraffin dann erstarren läßt.

Allgemeine Methoden.

Die wichtigsten Methoden beim Arbeiten mit Pilzen und Bakterien sind schon im III. Bande, S. 1204 von *Franz Fuhrmann* behandelt

worden. Hier seien deshalb nur ein Paar der Praxis entnommene Ergänzungen und Vereinfachungen angegeben, die gerade für in der Hauptsache chemisch ausgerüstete Laboratorien in Frage kommen. Dem schließt sich die Beschreibung einer aus der neuesten Zeit stammenden Methode: zur Überimpfung von Kulturen unter Luftabschluß, an.

1. Inkubieren.

Um die Kulturen auf geeigneter Temperatur zu erhalten, verwendet man Brutschränke, die mit Hilfe von Thermoregulatoren (vgl. Bd. I, S. 65) auf konstanter Temperatur gehalten werden. Gerade bei Stoffwechselversuchen sind aber diese Apparate meist im Platze zu beschränkt, denn große Kulturen sind gerade für chemische Zwecke erforderlich. Brutschränke gestatten vornehmlich auch nur in sehr beschränktem Maße die Ausführung verschiedener Manipulationen, wie Durchleiten von Gasen durch die Kulturen und andere kompliziertere Versuche. Man kann deshalb wirklich ungehemmt nur in Instituten arbeiten, die im Besitze eines Brutzimmers sind. Da viele Umsetzungen bei Bluttemperatur (37° C) vor sich gehen, so ist schon ein Brutzimmer, das konstant auf dieser Temperatur gehalten wird, von großem Nutzen. Andeutungen über die Einrichtung eines solchen Zimmers, wie es sich z. B. im chemischen Institut der Universität Berlin mit Gasheizung befindet, sind im Bd. I, S. 64 gegeben. Noch vorteilhafter ist ein Brutzimmer nach *Pfeffers* Angaben, wie es sich auch im landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut in Göttingen vorfindet. Denn in einem solchen kann man auf verschiedenen Höhen der angebrachten Regale verschieden hohe Temperaturen erzielen, die dann allen Bedürfnissen entsprechen. Allerdings ist die Temperaturkonstanz unter den gewährten Bedingungen keine so scharfe wie in einem einheitlich auf 37° eingestellten, mit Kupferblech ausgeschlagenen Zimmer. Will man aber für bestimmte Zwecke eine ganz konstante Bruttemperatur einhalten, so kann man im Brutzimmer immer noch einen Brutschrank mit Thermoregulator aufstellen. Die Kosten für Einbau eines Brutzimmers nach *Pfeffers* Angaben und der Betrieb mit Kohleheizung sind überdies verhältnismäßig gering, während Brutschränke recht kostspielig sind. Der Gewinn, den man durch ein Brutzimmer erzielt, ist also in jeder Weise verlockend. Große Flaschen oder zahlreiche Kulturen sind überhaupt nur in einem solchen unterzubringen.

Beschreibung des Brutzimmers nach *Pfeffer*.[1])

Wir halten uns hier an die Beschreibung des Brutzimmers im Leipziger botanischen Institut, dessen Heizeinrichtung Fig. 222 wiedergibt.

Das fragliche einfenstrige Zimmer liegt im Kellergeschoß und gewährt einen nutzbaren Raum von 4·6 *m* Länge, 3 *m* Breite und 3 *m* Höhe. Zu diesem Raum gelangt man durch einen, vermittelst der Wand *w* (siehe

---

[1]) *W. Pfeffer*, Ein Zimmer mit konstanter Temperatur. Ber. d. Deutsch. bot. Gesellschaft. Bd. **13**. S. 49 (1895).

die Figur) abgetrennten Vorraum, in welchem der Heizofen aufgestellt ist, und der als warmer Zwischenraum das Einströmen kalter Luft beim Öffnen der Türe verhindert.

Der zur Heizung dienende Meidinger Ofen (B 4 aus Kaiserslautern) ist derartig montiert, daß die im Mantel *o* aufsteigende warme Luft in die aufgemauerte Kammer und, bei der eingezeichneten Stellung der Metallklappe *d*, durch die Öffnung *a* in das Wärmezimmer geht. Befindet

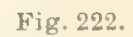


Fig. 222.

Heizeinrichtung eines Brutzimmers nach *Pfeffer*.

sich aber diese Klappe in der punktierten Lage *c*, so wird die warme Luft durch die Öffnung *b* in den Hausgang resp. in einen Schornstein gelenkt. Durch die Drehung dieser Klappe je um 90° wird regulatorisch die Zufuhr von Wärme zum Zimmer besorgt. Damit nach Drehung der Klappe in die Lage *c* die Zimmertemperatur nicht zu schnell fällt, ist dafür gesorgt, daß die Klappe in dieser Stellung nicht ganz abschließt und zudem kann durch Verengung der Öffnung *b* die Zufuhr von Wärme zum Wärmezimmer vermehrt werden.

Die Drehung der Klappe wird durch elektrische Auslösung veranlaßt und durch ein im Nebenzimmer aufgestelltes Gewichtsuhrwerk besorgt, dessen durch die Wand gehende Achse die Welle der Klappe bildet.

Die Auslösung besorgt ein unter der Decke des Wärmezimmers aufgestelltes Quecksilberthermometer. Ist in diesem der Kontakt unterbrochen, so befindet sich die Klappe in der Stellung *d*. Die im Zimmer zunehmende Wärme veranlaßt aber nach einiger Zeit durch den Schluß der Kette die elektromagnetische Anziehung eines Ankers im Uhrwerk und damit die Überführung der Klappe in die Stellung *c*, aus welcher sie nach Unterbrechung des Stromes wiederum in die Stellung *d* geführt wird. Ein Thermometer mit beliebig einstellbarem Kontakt hat sich vollkommen bewährt.

Auf diese Weise ist indes eine Temperaturkonstanz im Zimmer nur dann zu erzielen, wenn der Ofen jederzeit genügend Wärme spendet. Um dieses zu erreichen wird die Tür *k* geschlossen gehalten und alle Luft zu dem Feuerraume durch das Rohr *f* geführt. Mit dem Öffnen des Deckels bei *g* wird also die Luftzufuhr und damit die Verbrennung gesteigert. Ein solches weiteres Öffnen wird aber durch das Metallthermometer *i* besorgt, welches aus der aufgemauerten Luftkammer hervorsieht. Es ist dies ein stählernes Quecksilberthermometer mit Kapillarschraubenfeder, dessen Wirksamkeit auf der Drehung der Spirale durch die Ausdehnungsenergie des Quecksilbers beruht. Gegenwärtig ist die Regulation so eingestellt, daß die aus dem Mantel *o* hervorströmende Luft 90—100° C warm ist. Auch ist der in Sommer- und Wintertagen gleiche Konsum von Koks ein Beweis, daß diese Regulation für unsere Zwecke ausreicht.

In dem mit einer gut schließenden Tür versehenen Zimmer sind besondere Vorrichtungen gegen Wärmeverlust nicht getroffen. Nur gegen die nach Osten gerichtete Außenwand ist parallel mit dieser in einem Abstand von 20 *cm* eine Gipsdielenwand gezogen, in welcher, korrespondierend mit dem Hausfenster, ein Fenster eingesetzt ist. Das äußere Doppelfenster dieses Hausfensters wird im Winter noch besonders gedichtet. Eine zwischen Hauswand und Gipswand befindliche Rolljalousie genügt, um Temperaturschwankungen des Zimmers durch die Wirkung der Morgensonne zu verhüten.

Bei der gegenwärtigen Regulation des Zimmers beträgt die Temperatur dicht unter der Decke 37°, am Fußboden aber 22·5° C. Diese und alle zwischenliegenden Temperaturen stehen also gleichzeitig mit einer für die meisten Zwecke ausreichenden Konstanz zur Verfügung. Denn an demselben Punkte schwankt die Temperatur unter der Decke und bis zu Kopfhöhe während des ganzen Jahres nur um 0·3° C. In der Nähe des Bodens überschreiten die Oszillationen in einem Monat gewöhnlich nicht 0·3° C, doch ist hier die Temperatur im Winter durchschnittlich etwas niedriger als im Sommer, so daß die Extreme der Mitteltemperatur etwa 0·8° C betragen. Da dieser allmähliche Übergang bisher nicht störend war, so unterließ man die Ausführung einer Regulation (einer automatisch wirken-

der Luftmischung), die ursprünglich zur Beseitigung dieses Fehlers in Aussicht genommen war.

Infolge der wechselnden Wärmezufuhr oszilliert in Wirklichkeit die Temperatur, und zwar am meisten unter der Decke, um den Mittelwert. Diese Exkurse erreichen bei einem Thermometer mit minimalem Quecksilbergefäß ± 0·4° C, sind indes unmerklich, wenn das Thermometer in 5 cm^3 Wasser oder in etwas Erde taucht. Ebenso beschreibt das registrierende Metallthermometer eine vollkommen gerade Linie.

Daß diese Oszillationen nach abwärts schnell abnehmen, hängt mit der Ausbreitung der Wärme zusammen. Wie bekannt und wie nach Beimischung von Rauch leicht zu ersehen ist, breitet sich die aufsteigende erwärmte Luft unter der Decke aus, und von da aus wird durch Leitung und Mischung die Erwärmung der unteren Luftschichten besorgt. Die Beschleunigung der Mischung durch das Öffnen der Tür oder das Herumgehen einer Person veranlaßt indes unter den gegebenen Verhältnissen (großer Raum und ansehnlicher Wärmeverlust nach außen) nur die schon namhaft gemachten Temperaturschwankungen. Übrigens ergibt sich aus dem Gesagten die Notwendigkeit, das regulierende Thermometer unter der Decke anzubringen.

Abgesehen von der nächsten Nachbarschaft der Tür- und Fensterwand ist die Temperaturdifferenz in jeder gleich hohen Luftschicht nur gering, und in den mittleren Partien des Zimmers halten sich die Schwankungen in den angegebenen Grenzen. Die bei *a* einströmende warme Luft steigt zwischen dieser Öffnung und einer etwa $1^1/_2$ *m* abstehenden Schrankwand auf und in dieser Region ist natürlich von konstanter Temperatur keine Rede.

Um in demselben Zimmer die verschiedenen Temperaturen zu erreichen, mußte die Wärmezunahme mit der Erhebung in den Kauf genommen werden. Infolgedessen werden die verschiedenen Teile eines Gegenstandes ungleich erwärmt, und zwar beträgt die Temperatur für je 20 *cm* Erhebung im Mittel fast 1° C, da sich der Unterschied zwischen Fußboden und Decke auf 14·5° C stellt. Diese Differenz steigt im allgemeinen mit der Höhe der Erwärmung, und in den von uns angewandten Verhältnissen nimmt die Temperatur in den oberen Regionen schneller zu als in den unteren. Übrigens könnte durch Luftmischung mittelst bewegter Flügel im Innern eines geschlossenen Schrankes eine allseitig gleichmäßige Temperatur erreicht werden, und solches kann in Aussicht genommen werden, falls sich das Bedürfnis herausstellen sollte.

Die prozentische Dampfsättigung ist natürlich in den wärmeren Luftschichten geringer! Sie stellt sich unter der Decke auf 20—30, über dem Fußboden auf 50—60%, wenn die aus *a* hervortretende Luft über eine Wasserfläche mit konstantem Niveau und über gleichmäßig angefeuchtete Bimssteinstücke streicht. Durch Überdecken mit Glocken kann aber jederzeit der Aufenthalt der Versuchsobjekte in feuchter Luft erreicht werden.

Wo es auf höchste Genauigkeit ankommt, sind natürlich Thermostaten unentbehrlich. Letztere stellt man dann, wenn es sich um höhere Temperaturen handelt, in dem Wärmezimmer auf und erreicht auf diese Weise ein Maximum von Genauigkeit.

In den allermeisten Fällen reicht indes die im Zimmer gebotene Temperaturkonstanz völlig aus. Da für jeden der gebotenen Temperaturgrade eine große Fläche zur Verfügung steht, so genügt der Raum auch den Ansprüchen eines viel benutzten Institutes. Um aber in dem Zimmer trotz der oft massenhaften Versuche und Kulturen eine gute Luft zu erhalten, wurde mit Absicht, auf Kosten des Wärmeverlustes, für genügenden Luftwechsel gesorgt. Hierbei hilft der Ofen mit, der durch die in der Wand befindliche, mit Gaze überspannte Öffnung *l* Luft ansaugt.

Die regulatorische Zimmerheizung wäre einfacher durch einen Gasofen zu erreichen. Da aber Vorversuche ergaben, daß zur Erreichung des Zieles der jährliche Gaskonsum (1 cm^3 = 15 Pf.) sich auf 800—900 Mk. gestellt haben würde, ist die Ofenheizung vorzuziehen, welche nach den damaligen Berechnungen im Jahre einen Aufwand von weniger als 100 Mk. erforderte. Der Ofen verbrauchte nämlich durchschnittlich 12 *kg* Koks in 24 Stunden, welche derzeit 27 Pf. kosteten.

Die sehr einfache Bedienung des Ofens erfordert nur morgens und abends ein Auffüllen von Koks. Gleichzeitig wird das Uhrwerk aufgezogen, das übrigens erst in 24 Stunden abläuft. Ohne jede weitere Wartung hat der Ofen tadellos funktioniert. Für alle Fälle befindet sich im Wärmezimmer ein Alarmwerk, das in weit vernehmbarer Weise meldet, wenn die Temperatur die gewünschten Grenzen über- oder unterschreitet. Bislang wurde nur zweimal, und das bald nach Beginn des Betriebes, eine solche Meldung erstattet. Um auch an warmen Sommertagen genügenden Zug zu unterhalten, ist es wichtig, daß die Verbrennungsgase mit hoher Temperatur in den Schornstein gelangen. Deshalb wurde das Abzugsrohr *i* direkt durch die Heizkammer in den Schornstein geleitet.

2. Impfen.

Das Überimpfen ist von *Fuhrmann* S. 1228 beschrieben. Für gewöhnliche Zwecke kommt man mit einer Impfnadel (Abbildung 1229, 1—3) und einer Öse (4 und 5) aus. Auch größere Kulturflüssigkeiten impft man am besten in Schräglage, damit keine Verunreinigung aus der Luft hinein gerät.

Am sichersten geschieht das Umimpfen, Plattengießen etc. in einem Impfkasten, den man vorher durch Einleiten von Wasserdampf steril vorbereitet. Abbildung und Beschreibung eines solchen findet sich bei *E. Küster*, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. B. G. Teubner, Leipzig und Berlin, 1907, S. 63. Ist man nicht im Besitze eines solchen Kastens, so kann man sich einen solchen sehr vorteilhaft auf folgende Weise improvisieren, die ich von Prof. *Alfred Koch* in Göttingen gelernt habe. Man fertigt sich ein kubisches Drahtgestell aus verzinktem Eisendraht von

etwa 60 : 80 *cm* Kante. Dieses stellt man auf ein eingefeuchtetes Laken, welches man so um das Gestell herumlegt, das es von außen ganz damit bedeckt ist. Dadurch entsteht ein abgeschlossener feuchter Raum, in dem die Luftkeime nach einiger Zeit durch den sich niederschlagenden Wasserdampf niedergerissen werden. Will man impfen, so hebt man das Tuch auf einer Seite des Drahtgestells in die Höhe, so daß es obenauf zu liegen kommt. Man kann dann in dem feuchten, oben bedeckten Innenraum mit sehr verminderter Infektionsgefahr manipulieren.

3. Sterilisieren.

(*Fuhrmann*, S. 1204.)

Wenn irgend möglich, also immer dann, wenn Erde oder erdhaltige Substrate ausgeschaltet sind, sterilisiere man nicht im „Autoklaven". Die Gefahr der Zersetzung der Nährsubstrate oder wenigstens teilweiser Zersetzung wird durch Autoklavieren außerordentlich erhöht. Auch ist das fraktionierte Sterilisieren an drei aufeinander folgenden Tagen nach meinen Erfahrungen immer noch sicherer als das einmalige im überhitzten Wasserdampf. Saure Nährböden braucht man auch im strömenden Dampf nur einmal 15 Minuten zu sterilisieren; natürlich ist die Erhitzungsdauer der Größe der Flüssigkeitsmenge anzupassen. Für kleine Gefäße kann man an Stelle der kostspieligeren Dampftöpfe sehr gut einen emaillierten Kartoffelkocher verwenden, wie man sie in Küchengeräthandlungen zu kaufen bekommt. Der untere mit Wasser gefüllte Teil wird mit einem Bunsenbrenner erhitzt, der obere Teil mit dem durchlochten Boden enthält die Kulturgefäße. Er wird durch den Deckel verschlossen. Die Apparate sind praktisch und sehr billig. Die Kulturen bedeckt man mit Pergamentpapier, damit der sich niederschlagende Wasserdampf die Watte nicht anfeuchtet.

Einen angeheizten Autoklaven öffne man erst nach dem Abkühlen, da bei plötzlicher Druckentlastung ein Überkochen der Kulturflüssigkeit eintreten muß.

Gerade bei Stoffwechselversuchen lege man sich immer Rechenschaft davon ab, welche Veränderung von Nährsubstraten durch das Sterilisieren vor sich gehen kann. Stickstoffhaltige Substanzen wie Harnstoff, Azetamid etc. geben oft Ammoniak ab. Aus diesem Grunde wurden sie häufig fälschlich als Stickstoffquellen geeignet gefunden. Bei derartigen Gefahren sterilisiere man so gefährdete Substanzen in der Kälte durch Filtration (*Fuhrmann*, S. 1209) und vereinige sie erst nachher mit dem Rest des durch Wärme sterilisierten Hauptteils der Kulturflüssigkeiten.

4. Nährböden im allgemeinen.

(*Fuhrmann*, S. 1212.)

Neben den dort angegebenen Nährböden sei hier noch die Herstellung eines Mostes, der sich zur Hefezucht sehr gut eignet, angegeben. [1])

[1]) Privatmitteilung von Prof. *Alfred Koch*, Göttingen.

Rosinenmost.

20 *l* Wasser und 15 Pfund gute Rosinen werden 1—2 Tage zusammen stehen gelassen. Dann werden die Rosinen zerquetscht. Die Maische bleibt noch ein paar Tage stehen. Hierauf wird abgekeltert und dem Most 4 *g* Salmiak zugesetzt, um ihn auf den nötigen Stickstoffgehalt zu bringen. Dann wird einmal aufgekocht und klar filtriert.

Die einfache mineralische Nährlösung *A. Meyers* (*Fuhrmann*, S. 1220), die das Mineralsalzbedürfnis der meisten Mikroorganismen befriedigt, kann noch vereinfacht werden. Man braucht nur Spuren von Na Cl und Eisenchlorid oder -sulfat. $CaCl_2$ setze ich nicht zu, da die aus dem Glas stammende Menge Kalzium immer genügt. Ich verwende also nur 0·05% K_2HPO_4 für alkalische oder 0·05% KH_2PO_4 für saure Nährböden und 0·01% $MgSO_4 + 7 H_2O$ plus Spuren von Na Cl und $FeSO_4$.

Auf die speziellen Nährböden wird im einzelnen hingewiesen.

Es sei noch erwähnt, daß man agarhaltige Nährsubstrate durch 1/4stündiges Kochen über der Flamme weit leichter filtrierbar machen kann. Meist genügt eine Filtration durch wenig entfettete (Wund-)Watte. Für viele Zwecke, z. B. gerade für Schimmelpilzkulturen, genügt schon ein nicht filtrierter Aprikosendekoktagar. Er zeichnet sich durch hellere Farbe als Pflaumendekoktagar aus. Die getrockneten Aprikosen sind gleichfalls sehr preiswert. (Empfohlen von *E. Pringsheim*, Halle.)

5. Reinkulturmethoden.

Neben den von *Fuhrmann* S. 1228 angegebenen Verfahren sei hier noch auf die neue Methode von *Burri* [1]) hingewiesen, die sich sehr bewährt hat. Sie verdient besonders auch Beachtung bei der Lösung von deszendenztheoretisch wichtigen Fragen, da hier das Ausgehen von einer Zelle auch bei Bakterien verbürgt sein sollte. [2]) Eine Beschreibung derselben findet sich bei *Fuhrmann* in diesem Bande, Teil 1, S. 585.

6. Züchtung anaerober Bakterien.

Die Hauptmethoden für diesen Zweck sind bereits von *Fuhrmann*, Bd. III, S. 1238 beschrieben worden. Für den gleichen Zweck kann man auch einen von *Arthur Meyer* [3]) beschriebenen Apparat benutzen, der gleichzeitig gestattet, die Sauerstoffminima und Maxima für Keimung, Wachstum und Sporenbildung zu bestimmen. Dieser Apparat wurde von *Fuhrmann* im Teil 1, S. 592 beschrieben. Hier sei noch ein einfacheres

[1]) *Burri*, Das Tuscheverfahren. G. Fischer. Jena 1909.

[2]) Vgl. z. B. *A. Kowalenko*, Studien über sogenannte Mutationserscheinungen bei Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der Einzelkultur. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 66 (1910). S. 277. — *Burri* und *Andrejew*, Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. 56 (1910). S. 217. — *H. Pringsheim*, Med. Klinik. Jahrg. 1911. Nr. 4.

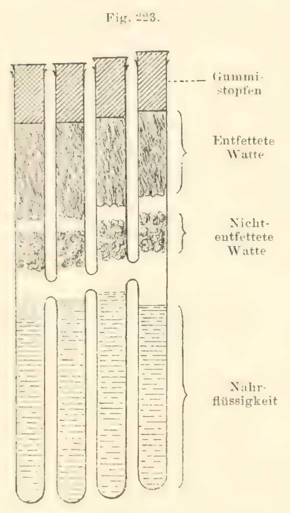
[3]) *Arthur Meyer*, Apparat für die Kultur von anaeroben Bakterien und für die Bestimmung der Sauerstoffminima für Keimung, Wachstum und Sporenbildung der Bakterienspezies. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 15 (1906). S. 337.

Verfahren beschrieben, das es gestattet, Überimpfungen in sauerstofffreier Atmosphäre vorzunehmen und den Beweis zu führen, daß anaerobe und auch fakultativ anaerobe Bakterien unter völligem Ausschluß des Sauerstoffs viele Generationen durchleben können.

Methode zur sukzessiven Überimpfung in größerer Zahl bei dauerndem Ausschluß des Sauerstoffs.[1])

Zu diesem Zwecke bedient man sich einer Reihe starker Reagenzgläser, die, wie nebenstehende Abbildung zeigt, durch Querröhrchen derart verbunden sind, daß der verbindende Gang vom zweiten zum dritten höher zu liegen kommt, als der vom ersten ins zweite Reagenzglas. In gleicher Weise wird ein viertes an das dritte Reagenzglas angeschlossen usw. Unsere Abbildung zeigt eine Viererreihe. Man kann auch längere Reihen herstellen und die Überimpfungen in ihnen vornehmen. *Kürsteiner* ließ so Anaerobe bis zu 16 Reihen passieren, z. B. den Bac. putrificus *(Bienstock)* und den beweglichen Buttersäurebazillus. Man verfährt folgendermaßen: Zuerst wird der Apparat, auf einen Drahtkorb gebunden, fraktioniert im Dampftopf sterilisiert, wozu die einzelnen Reagenzgläser mit nicht entfetteter Watte verschlossen wurden. Dann wird der flüssige Nährboden mittelst steriler Pipette in jedes Glas eingefüllt und die ganze Reihe vorsichtshalber nochmals fraktioniert sterilisiert. Die einzige Schwierigkeit bei der Herstellung einer solchen Kulturreihe besteht in dem richtigen Auffüllen der einzelnen Gläser. Um das zu lernen, kann man die einzelnen Gläser mit Wasser füllen und durch Neigen der Reihe die für die Überimpfung richtigen Niveaus bestimmen und mit Blaustift markieren. Es wird sich dann herausstellen, daß man die Gläser derart füllen muß, daß ein leichtes Neigen der Reihe genügt, um Material aus dem ersten ins zweite Glas hinüberzubringen. Dieses wird dadurch so weit aufgefüllt, daß ein weiteres schwaches Neigen genügt, um die sterile Nährflüssigkeit des dritten einwandfrei aus dem zweiten Glase impfen zu können. So schreitet man mit der Impfung fort, bis das letzte Glied, das natürlich nicht ganz voll zu sein braucht, erreicht ist. Um die Reihe sauerstofffrei zu machen,

Fig. 223.



Apparat zur Überimpfung bei Luftausschluß nach *Kürsteiner*.

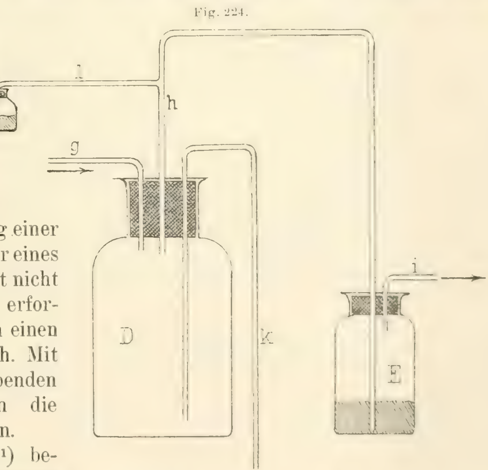
[1]) *J. Kürsteiner*, Beiträge zur Untersuchungstechnik obligat anaerober Bakterien sowie zur Lehre von der Anaerobiose überhaupt. Ebenda. Bd. **19** (1907). S. 207.

werden, nachdem das erste Reagenzglas mit der zu prüfenden Kultur beimpft wurde, die sterilen Wattepfropfen abgeflammt, die verkohlte, aus den Gläsern ragende Watte abgeschnitten und nun der so behandelte sterile Wattepfropf mittelst Pinzette ziemlich weit in die Gläschen hineingestoßen. Auf diesen sterilen Wattebausch (vgl. immer die Figur) stößt man einen entfetteten, hygroskopischen Wattebausch, der nicht unbedingt steril zu sein braucht, da der unter ihm befindliche sterile Wattepfropf einen vollständig genügenden sterilen Abschluß bietet. In den hygroskopischen Wattebausch gießt man nun je 1 *cm*³ 20%iger Pyrogallussäure und 1 *cm*³ 30%iger Kalilauge. Darauf werden die Gläser sofort mit gut passenden, vorher schnell an den Wandungen benetzten Kautschukpfropfen verschlossen. Die Benetzung bedingt zwei Vorteile: Ein leichteres Eindringen des Pfropfens und einen ausgezeichneten, vollkommen genügenden Verschluß der Reagenzgläser. Man kann sich durch Kultur von Leuchtbakterien in derartig verschlossenen Gläsern überzeugen, daß bald das Leuchten aufhört und demnach aller Sauerstoff absorbiert ist.

7. Methodik der Durchlüftung von Kulturen.

In häufigen Fällen ist man gezwungen, Mikroorganismenkulturen zu durchlüften, um für genügende Sauerstoffzufuhr zu sorgen. Bisweilen muß man auch in anderen Gasen als Luft kultivieren, z. B. im Stickstoffstrom, oder man will die bei aerober Kultur entweichenden Stoffwechselgase auffangen. Die Verwendung einer Wasserstrahlpumpe oder eines Wasserstrahlgebläses ist nicht immer möglich. Auch erfordern diese Apparaturen einen großen Wasserverbrauch. Mit Hilfe des zu beschreibenden Apparates kann man die Schwierigkeiten beheben.

Fig. 224.



Vorrichtung zum Durchlüften von Kulturgefäßen.

Die Vorrichtung[1]) besteht aus einer mittelgroßen Flasche *D* (vgl. Fig. 224), die mit einem dreifach durchbohrten Pfropfen verschlossen ist. In diese

[1]) Nach *Alfred Koch*, Über Verschlüsse und Lüftungseinrichtungen für reine Kulturen. Zentralb. f. Bakt. I. Abt. Bd. 13 (1893). S. 252.

läuft kontinuierlich durch Rohr *g* langsam Wasser und drückt die Luft durch Rohr *h* durch die Flüssigkeit in Flasche *E* und durch Rohr *i* in die Kultur. Wenn aber Flasche *D* ungefähr bis zu dem Punkte, wo Buchstabe *h* steht, vollgelaufen ist, so fängt der aus einem recht weiten Rohr herzustellende Heber *k* zu wirken an und entleert Flasche *D* in wenigen Minuten. Dabei wird die Flüssigkeit aus Flasche *E* in Rohr *h* etwas angesaugt, Luft tritt aber in Flasche *D* durch Flasche *F* und Rohr *l* ein. Wenn Flasche *D* fast leer ist, so läßt der Heber *k*, wenn er aus einem genügend weiten Rohr hergestellt ist, das Wasser fallen und das während dieser ganzen Zeit durch Rohr *g* weiterlaufende Wasser drängt die Luft wieder wie vorher durch *h* in *E*. Einen anderen Ausweg hat die Luft jetzt nicht, weil Heber *k* durch das Wasser selbst und das Lufteintrittsrohr der Flasche *F* ebenfalls durch Flüssigkeit gesperrt ist. Zur Erzielung eines gleichmäßigen Luftstromes ist es wichtig, Rohr *l* T-förmig in Rohr *h* münden zu lassen und nicht etwa direkt durch den Pfropfen in Flasche *D* zu führen, weil sonst kleine Wassermengen in Rohr *h* sitzen bleiben und die aus *D* verdrängte Luft sich dann ruckweise durch diese durcharbeiten kann.

8. Abtrennen von Mikroorganismen aus Flüssigkeitskulturen.

Häufig ist es notwendig, Mikroorganismen aus Flüssigkeitskulturen herauszubekommen, entweder weil man die Lösungen untersuchen oder weil man die Mikroorganismen selbst für irgend welche Stoffwechselversuche in andere Bedingungen übertragen will.

In beiden Fällen kommt man bei Schimmelpilzen durch gewöhnliche Filtration zum Ziele. Hefe und auch andere weniger zusammenhängende Mikroorganismen entfernt man durch Filtration über Kieselgur. Zu diesem Zwecke bringt man auf das feuchte Filter in einer Nutsche eine Kieselguraufschwemmung, die man zuerst absaugt. Das so vorbereitete Filter läßt so wenig Hefezellen durch, daß man klare Filtrate enthält. Züchtet man sich Hefereinkulturen, um z. B. bestimmte Zuckerlösungen zu vergären, so kann man die Hefe auf dieselbe Weise abfiltrieren und sie dann mit dem Kieselgur in die neue Lösung übertragen, aus der man sie, nachdem sie ihre Gärfunktion erfüllt hat, zusammen mit derselben Kieselgurmenge abnutscht. Bakterien kann man mit Sicherheit nur durch Tonfilter abfiltrieren, wie ja überhaupt nur auf diese Weise keimfrei filtriert werden kann. Über derartige Filter vergl. Bd. I, S. 106. Will man Bakterien als Masse gewinnen, so muß man sie abzentrifugieren. Die Methode, sie auf Platten zu züchten und von der Oberfläche abzukratzen, ist weniger einwandfrei und sauber, kann aber manchmal nicht umgangen werden.

Mineralstoffwechsel.

I. Bedarf an Aschenbestandteilen.

Neben den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff bedürfen die Mikroorganismen wie alle anderen Lebewesen noch gewisser

mineralischer Stoffe, die beim Veraschen als nichtverbrennbare Rückstände übrig bleiben und die man deshalb zweckmäßig als Aschenbestandteile zu bezeichnen pflegt. Die Bindungsform, in der diese Elemente geboten werden müssen, scheint eine weniger beschränkte zu sein als die der erstgenannten Elemente. Doch liegen hier noch wenig genaue Untersuchungen vor. Es würde aber gewiß von Interesse sein, zu erforschen, welche Bindungsformen der Aschensubstanzen bevorzugt werden und im speziellen auch die Frage zu beantworten, bis zu welchem Grade sich die anorganischen Salze durch organische Komplexe ersetzen lassen.[1] Bisher hat man sich vornehmlich damit beschäftigt zu ergründen, welche Elemente als unbedingte Bestandteile der Nährlösungen erforderlich sind und wie weit sie durch andere aus den entsprechenden Gruppen des periodischen Systems zu ersetzen sind. Schon *Nägeli* hat dieser Frage sein Interesse zugewandt. In der Hauptsache aber müssen uns die Arbeiten interessieren, welche auf die Reinheit der gebotenen Nährstoffe einschließlich des Wassers und auf die Eignung der Kulturgefäße bei solchen Versuchen die erforderliche Rücksicht nahmen. Denn bei dem geringen Bedürfnis nach manchen Nährsalzen und dem großen Auslesevermögen für sie, das den Mikroorganismen innewohnt, muß naturgemäß mit denselben Vorsichtsmaßregeln verfahren werden, die etwa bei einer Atomgewichtsbestimmung zu fordern sind. Deshalb wäre eine präzise Bearbeitung dieses Gebietes von Spezialisten dieser Richtung am ehesten zu leisten. Daß hier noch viel zu tun ist, erhellt nicht nur aus der Tatsache, daß im Grunde genommen nur die Schimmelpilze auf ihr Aschensubstanzbedürfnis in eingehender Weise geprüft sind, sondern z. B. auch aus der Behauptung *Fermis*[2], daß Aspergillus niger, der in Kästen aus verschiedenen Metallarten kultiviert wurde, nur Asche zurückließ, die aus dem einen Metall bestand.

Demgegenüber sind die Verfasser, an deren Untersuchungen wir uns vornehmlich zu halten haben, *Benecke*[3]) und *Molisch*[4]), zu ganz anderen Ergebnissen gelangt. Schwefel, Phosphor, Magnesium und Eisen sind nach ihnen unersetzlich. Kalzium ist in verschiedenen Fällen dagegen nicht erforderlich. Kalium kann zum mindesten für die Sporenkeimung nicht entbehrt werden. Durch Natrium und Lithium kann es nicht vertreten

[1]) Inzwischen hat *Dox*, Journ. of Biological chemistry, Vol. X, p. 77 (1911) gezeigt, daß dreiwertiger Phosphor, im Natriumhypophosphit und Natriumphosphit, für die Assimilation durch Aspergillus niger ungeeignet ist.

[2]) *C. Fermi*, Mikrobische Asche, vorzugsweise aus einem einzigen Metalle bestehend. Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Bd. **29**. S. 9 (1901).

[3]) *Benecke*, Ein Beitrag zur mineralischen Nahrung der Pflanzen. Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. Bd. **12** (1894). S. 105. — Die Bedeutung des Kaliums und des Magnesiums für Entwicklung und Wachstum des Aspergillus niger v. Th. sowie einiger anderer Pilzformen. Botanische Zeitung. Bd. **54** (1896). S. 97. — Die zur Ernährung der Schimmelpilze notwendigen Metalle. Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik. Bd. 28 (1895). S. 487.

[4]) *Molisch*, Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. Sitzungsber. d. kaiserl. Akad. Wien. Mathem.-naturwiss. Klasse. **103** (1894). S. 554. — Die Pflanze in ihrer Beziehung zum Eisen. Jena 1892.

werden; dagegen gelingt die Myzelentwicklung, wenn auch nicht die Sporenbildung auch beim Ersatz des Kaliums durch Rubidium. Ebenso wie das Rubidium verhält sich das Caesium.

Methodisches. Bezüglich der Kulturgefäße sei folgendes bemerkt: Ideal wären natürlich Platin- oder Goldgefäße. Ihr Mangel besteht nur in der Undurchsichtigkeit. Infolge des hohen Preises sind sie nicht in genügender Menge zu beschaffen, um zahlreiche Vergleichsversuche anzustellen. Andere Metallgefäße sind wegen der Giftigkeit gefahrvoll. Die Autoren griffen deshalb doch auf Glasgefäße zurück. Beim Ausschluß von Magnesium reicht gewöhnliches Kaliglas, das frei von diesem Element ist, aus. Calcium und Silicium kann man durch Paraffinieren der Kulturgefäße ausschalten. Die Paraffingefäße werden nach *Molisch* folgendermaßen hergestellt [1]: Erlenmeyerkolben werden gut gereinigt, im Trockenschrank getrocknet, so daß auch nicht ein Hauch von Feuchtigkeit an ihrer Innenseite zu sehen ist, nachher mit einigen Stückchen feinsten, weißen Paraffins (Schmelzpunkt 72—78°) versehen, mit Watte verstöpselt, neuerdings in den Trockenkasten gegeben und rund $^1/_2$ Stunde bei 120° gehalten. Dadurch sind die Kolben sterilisiert und das Paraffin geschmolzen. Nun läßt man etwas abkühlen und verteilt dann unter stetem Drehen des schräg gehaltenen Kölbchens das erstarrende Paraffin so an der Innenwand des Kölbchens bis knapp an den Wattepfropf heran, daß das ganze Innere schließlich völlig von einem weißen Paraffinmantel ausgekleidet ist. Damit sind die Versuchskölbchen für die Aufnahme der Nährlösungen bereit.

Das Abmessen der Nährflüssigkeit etc. muß natürlich auch in paraffinierten Gefäßen geschehen. Um Kalium auszuschalten, bediente sich *Benecke* mit Vorliebe des Jenaer Normalglases von *Schott & Gen.* [2]) Das Jenaer Glas ist vor allem auch deshalb wertvoll, weil seine Löslichkeit bei dem zur Sterilisation notwendigen Erhitzen nicht so wie die anderen Gläser zunimmt. Bei der Prüfung auf das Eisenbedürfnis unterließ *Molisch* lieber das Sterilisieren, um der Gefahr der Löslichmachung aus dem Glase vorzubeugen. Bei der Prüfung auf andere Elemente wird man sich genauer aus der speziellen Literatur informieren müssen. Die Kulturgefäße werden vorteilhaft ausgedämpft. Man setzt auf einen Kolben, in welchem Wasser siedet, zunächst einen Trichter, in dessen Hals mittelst Kork eine Glasröhre befestigt ist. Auf diese kommen mit der Öffnung nach unten die zu behandelnden Flaschen und Gläser; das verdichtete Wasser fließt in den Trichter; hat sich viel dort angesammelt, so läßt man es durch Lüften des Stopfens in die Flasche laufen (*Abegg*). Eine Behandlung von 10—15 Minuten pflegt ausreichend zu sein; alsdann läßt man sofort die Gläser durch einen Luftstrom trocknen. Die Verbesserung, welche die Gläser hierbei erfahren, ist sehr auffällig. [3])

[1]) *Oswald Richter,* Die Ernährung der Algen. W. Klinkhardt. Leipzig 1911. S. 1.

[2]) *Schott & Gen.* fabrizieren neuerdings ein noch schwerer lösliches Glas, das mit blauem Stempel versehen ist.

[3]) *Ostwald-Luther,* Physiko-chemische Messungen. Leipzig. W. Engelmann. 1902. S. 403.

Das in gewöhnlicher Weise hergestellte destillierte Wasser ist für den hier in Frage kommenden Zweck unbrauchbar. Eisen z. B. läßt sich in seinem Abdampfrückstand nachweisen. Man verwendet deshalb nochmals destilliertes Wasser, dessen Dampf in einem Kühlgefäß aus Platin kondensiert wird und das man in einer großen bedeckten Platinschale auffängt. 100 *cm*³ solchen Wassers hinterlassen keinen Rückstand.

Besonderer Wert ist naturgemäß auch auf die Reinheit der zur Herstellung der Nährflüssigkeiten zu verwendenden Substanzen zu legen. Auch die als reinste Reagenzien käuflich zu erhaltenden Substanzen sind hier nicht ohne weiteres anwendbar. Bei der Prüfung auf Reinheit muß man sich des spektroskopischen Nachweises bedienen. *Molisch* bediente sich folgender Aschensubstanzen: Magnesiumsulfat, das durch dreimaliges Umkristallisieren gereinigt war; Monokaliumphosphat, durch Vermischen von Phosphorsäure (gewonnen durch Sublimation von Phosphorpentoxyd) und zweimal umkristallisiertem Kaliumbikarbonat dargestellt. Chlorammonium, das in Platingefäßen sublimiert war. Auch die organischen Bestandteile des Nährbodens sind wenn möglich aus flüchtigen Substanzen zusammenzusetzen. Als Kohlenstoffquellen kommen so z. B. im Vakuum destilliertes Glyzerin und Ammoniumazetat in Frage. Letzteres wurde aus dreimal destillierter Essigsäure, in die man bis zur neutralen Reaktion Ammoniak eingeleitet, zusammengestellt. Dieses Präparat war dann eisenfrei. Zucker ist wegen seiner Nichtflüchtigkeit weniger gut anwendbar. Immerhin konnte nach zweimaligem Umkristallisieren — bei jemaliger Anwendung von 5—10 *g* — ein Rohrzucker erhalten werden, der eben noch merkbare Spuren von Asche hinterließ, in der Eisen aber nicht mehr nachweisbar war. — Diese Fingerzeige müssen genügen, um die Anforderungen an die notwendige Exaktheit derartiger Versuchsanstellungen zu charakterisieren.

II. Mineralstoffe als Energiequellen.

Bei der Oxydation mineralischer Stoffe, z. B. beim Übergang von der Oxydul- in die Oxydform, wird Energie frei. Diese frei werdende Energie steht der Ausnutzung durch Mikroorganismen zur Verfügung. Derartige Prozesse sind bisher bei der Oxydation von Eisenoxydul- zu Eisenoxydsalzen, bei der Nitrifikation des Ammoniaks und der Verbrennung einiger Gase, z. B. H, H_2S, CH_4, beobachtet worden. Letztere ordnen sich am besten im Gasstoffwechsel ein, so daß hier nur die durch Eisenbakterien zu beschreiben sind. Damit soll aber nicht gesagt sein, daß sich bei geeigneter Kulturtechnik nicht der Nachweis wird führen lassen, daß auch andere Oxydationen mineralischer Stoffe unter Energiegewinn durch Mikroorganismen zustande kommen können. Vornehmlich liegt der Gedanke an derartige Ausnutzungen bei den Mangansalzen durch manche Erfahrungen mit Eisenbakterien nahe.

Die Eisenbakterien.

Es war *Winogradsky*[1]), der in seiner grundlegenden Arbeit auf diese Verhältnisse bei den Eisenbakterien hindeutete, zu einer Zeit, wo derartige Gedanken noch sehr fern lagen. In der Natur finden sich nun verschiedene Arten von Eisenbakterien, deren Beschreibung hier unangebracht wäre. Es sei auf die Monographie von *Molisch*[2]) hingewiesen. Dieser Autor, dem zuerst die Reinkultur eines Eisenbakteriums, der Chlamydothrix (Leptothrix) ochracea, gelungen ist, trat den *Winogradsky*schen Anschauungen energisch entgegen. Mit Hilfe seiner auf Manganpepton gewonnenen Reinkultur glaubte er den Beweis geliefert zu haben, daß die Eisenbakterien ohne organische Substanzen nicht auskommen können, und daß die Einlagerung von Eisensalzen, die sich bei ihnen vorfindet, unter geeigneten Ernährungsbedingungen umgangen werden kann, — daß das Eisen also für die Bakterien nur eine nebensächliche Rolle spiele. Kurz darauf gelang aber *Lieske*[3]) die Reinkultur einer anderen Eisenbakterie, des Spirophyllum ferrugineum, dessen Physiologie in jeder Beziehung den *Winogradsky*schen Forderungen entspricht. Diese Form gedeiht auf Nährsubstraten, die frei von organischer Substanz sind. Sie bedarf zu ihrer Entwicklung der bei der Oxydation von Eisenoxydulsalzen frei werdenden Energie, mit Hilfe derer sie die Kohlensäure der Luft assimiliert. Durch andere Salze, z. B. durch Mangansalze, konnte das Eisen nicht ersetzt werden.

Nach diesen Befunden zu urteilen, unterscheiden sich die verschiedenen Eisenbakterien in wesentlichen Punkten. Die verschiedenen Formen können bezüglich ihres Nahrungsbedürfnisses wechselnde und noch ungeklärte Anforderungen stellen.

Wir müssen uns hier daher mit der Beschreibung der Isolierungsverfahren der beiden in Reinkultur erhaltenen Formen begnügen und es zukünftiger Forschung überlassen, für die Kultur anderer mit Hilfe der bisher gewonnenen Erfahrungen neue Methoden auszudenken.

Reinkultur von Chlamydothrix ochracea (nach Molisch).

Wenn man zum Prager Leitungswasser etwa 0·05% Manganpepton hinzufügt und die Lösung in einem Becherglase, bedeckt mit einer Glasplatte, ruhig im Finstern oder im diffusen Lichte stehen läßt, so treten am Wasserspiegel bei Zimmertemperatur schon nach 3—4 Tagen oder später braune Punkte und Flöckchen auf, die sich vorzugsweise aus der gesuchten Bakterienart zusammensetzen. Nach 1—2 Wochen entsteht eine tiefbraune Decke, die oft der Hauptmasse nach aus Chlamydothrix besteht. Um von

[1]) *Winogradsky*, Über Eisenbakterien. Botanische Zeitung. Bd. **46**. S. 261 (1888).

[2]) *H. Molisch*, Die Eisenbakterien. G. Fischer. Jena 1910.

[3]) *Rudolf Lieske*, Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Spirophyllum ferrugineum Ellis, einem typischen Eisenbakterium. Diss. Leipzig 1911. Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik. Bd. **49**. Heft 1 (1911).

dieser Anhäufungskultur auf festem Nährboden zu Reinkulturen zu gelangen, muß man zuerst das Ausschwärmen von Schwärmern veranlassen, da sonst eine andere Bakterienart nicht loszuwerden ist. Zu diesem Zwecke impft man die verunreinigte Kultur in eine Nährlösung, bestehend aus 2% Pepton in Moldauwasser (man kann wohl auch das später zu erwähnende Torfwasser nehmen) über, worauf sich in 1—3 Tagen zahlreiche Chlamydothrix-Schwärmer entwickeln.

Das beste Substrat zur Reinkultur ist:

1000 *g* Torfwasser (gewonnen durch Auskochen eines faustgroßen Stückes eines Torfziegels in 1 *l* destilliertem Wasser);

0·25 *g* Manganpepton (*E. de Haën,* Chemische Fabrik, List, Selze bei Hannover);

100 *g* Gelatine.

Die Lösung wird vor dem Erstarren mit Normalalkali schwach alkalisch gemacht, weil die Chlamydothrix in dem sauren Medium nicht wächst.

Nach etwa 9 Tagen erreichen die Kolonien auf der Gelatine bei Zimmertemperatur im diffusen Licht oder im Finstern einen Durchmesser von $^1/_2$—2 *mm.* Sie sind zumeist kugelig, anfangs farblos oder wenig gelblich, später rostbraun und sinken nach längerer Zeit nach und nach schalenförmig in die Gelatine ein.

Bei Abimpfung auf steriles Hochquellenwasser mit 0·025% Manganpepton gedeiht das Bakterium üppig. Besonders auf weichen Wässern bedeckt sich der Flüssigkeitsspiegel oft mit einer bis 3 *mm* dicken, festgeschlossenen Decke der Eisenbakterien. Die Vermehrung geschieht durch Zerbrechen der Fäden, Abgliedern der Endzellen und durch die Schwärmer.

Reinkultur von Spirophyllum ferrugineum (nach Lieske).

Die Rohkulturen werden hergestellt, indem man Erlenmeyerkolben mit Leitungswasser füllt und große Eisenfeilspäne zugibt. Weiter setzt man noch wenig eines Extraktes von alten Blättern zu, der aber lediglich als Kohlensäurequelle dient. Man darf nicht soviel Blätterextrakt zusetzen, daß die Flüssigkeit deutlich gelb gefärbt wird, da dann die organische Substanz bereits wachstumshemmend wirkt. Man impft mit etwas Sand oder altem Laub aus einem Spirophyllum-haltigen Bache. Doch genügt auch schon Zusatz von etwas Leipziger Leitungswasser, das stets Spirophyllum enthält. Das Wachstum beginnt meist am 4. Tage. Impft man aus so hergestellten Kulturen wiederholt in sterile Kolben, so kann man Kolonien von so großer Reinheit erhalten, daß es bei mikroskopischer Prüfung kaum gelingt, fremde Bakterien oder andere Organismen zu entdecken.

Zur Reinkultur gelangt man auf folgende Weise: Kleine Erlenmeyerkolben von ungefähr 100 *cm*³ Inhalt werden ca. 2 *cm* hoch mit folgender Nährlösung gefüllt:

$(NH_4)_2SO_4$	1·5 *g*
KCl	0·05 *g*
$MgSO_4$	0·05 *g*
K_2HPO_4	0·05 *g*
$Ca(NO_3)_2$	0·01 *g*
H_2O dest.	1000 *g*

Hierauf werden die Kolben gut mit Watte verschlossen und im Dampftopf sterilisiert. Dann werden grobe Feilspäne aus weichem Eisen in einem gut verschlossenen Reagenzglas im Trockenschranke eine Stunde lang ca. auf 160° erhitzt. Nachdem man die Kolben aus dem Sterilisator genommen hat, läßt man sie mindestens 3 Tage lang unter einer leicht mit Watte verschlossenen Glasglocke an der atmosphärischen Luft stehen. Hierauf gibt man in einem sterilen Raum (Impfkasten) von den sterilisierten Eisenfeilspänen ungefähr 0·05 *g* in jeden Kolben und impft mit einer feinen sterilen Pipette aus einer bereits vorhandenen Kultur oder mit Rohmaterial. Für die Herstellung von Reinkulturen empfiehlt es sich, nur junge, schnell wachsende Kulturen, bei denen noch die einzelnen, aus dem Impfmaterial entstandenen Kolonien zu unterscheiden sind, zur Abimpfung zu verwenden. Es genügt eine sehr geringe Menge von Impfmaterial. Hierauf bringt man die geimpften Kolben unter eine Glasglocke, in die man so viel Kohlensäure einleitet, daß die Luft in der Glocke ungefähr 1% davon enthält und setzt die Kultur an einen kühlen Ort. Das Wachstum beginnt ungefähr nach 4 Tagen. Die Spirophyllum-Fäden wachsen als zusammenhängende Decke auf dem Boden des Gefäßes über den Eisenfeilspänen oder sie setzen sich als feine hellgelbe Flocken an den Wänden des Gefäßes an.

Bedingungen für Gelingen der Kultur sind: geringer Nährsalzgehalt, getrenntes Sterilisieren der Nährflüssigkeit und des Eisens und Stehenlassen der Nährflüssigkeit behufs Sättigung mit Sauerstoff und Kohlensäure. Das offizinelle Eisenpulver oder mit Wasserstoff reduziertes Eisen sind unverwendbar, da diese Eisensorten zu schnell in Oxydhydrat übergehen. Die groben Feilspäne werden von der im Wasser absorbierten Kohlensäure allmählich als doppelkohlensaures Salz gelöst. Der hierbei entstandene Wasserstoff sammelt sich zuweilen in Form von großen Blasen unter der über den Feilspänen wachsenden Bakteriendecke an. Wenn die Bakterien in lockeren Flocken in der Kultur wachsen, dann steigt der Wasserstoff in kleinen Blasen an die Oberfläche. Solange sich noch metallisches Eisen in der Kultur befindet, ist ihr Gehalt an Eisenoxydulkarbonat annähernd konstant und beträgt 0·01%.

Von 5 Kulturkölbchen, die mit Material geimpft waren, das aus einer 11mal übergeimpften Kultur stammte, erwiesen sich zwei als rein. Die Reinheit wurde nicht nur mikroskopisch, sondern auch dadurch erwiesen, daß sterile Peptonlösung und Nährgelatine beim Beimpfen steril blieben.

Folgende Einflüsse auf das Wachstum des Spirophyllum sind noch zu beobachten: Temperaturoptimum bei 6°, Sauerstoff ist nötig, dagegen

hat das Licht keinen Einfluß. Das Bakterium ist nicht imstande, seinen Kohlenstoff aus organischer Substanz zu decken; derselbe stammt aus der Kohlensäure der Luft, von der allerdings nur geringe Mengen assimiliert werden, was aber zum Teil dadurch seine Erklärung findet, daß die lebenden Bakterienfäden bis 90% Wasser erhalten. Ohne Eisenzusatz war ein Wachstum nicht zu erzielen. Der Ersatz des Eisens durch andere Metalle, z. B. Mangan, gelang nicht; auch konnte das Eisenoxydulkarbonat durch andere Eisenoxyd- oder Oxydulsalze nicht vertreten werden.

Kohlenhydratstoffwechsel.

Im Kohlenhydratstoffwechsel braucht uns nur der Abbau zu beschäftigen. Die Methodik der Erforschung der Kohlensäureassimilation, die außer bei den chlorophyllhaltigen Algen und Flagellaten noch bei nitrifizierenden, bei Schwefel- und Eisenbakterien etc. in Frage kommt, ist für niedere Organismen nicht speziell ausgebildet worden. Man halte sich daher für eventuelle Fälle an die Methoden bei höheren Pflanzen.[1]) Die Endprodukte der Kohlenstoffassimilation, wie sie in Gestalt von Körper- und Reservesubstanz in Erscheinung treten, sind einer rein chemischen Erforschung zugänglich. Im Abbau tritt also das Erfordernis einer speziellen Methode erst zutage. Er folgt im allgemeinen zuerst dem durch Säurehydrolyse erreichbaren, soweit die Verarbeitung von Polysacchariden in Frage kommt. Doch muß von vornherein bemerkt werden, daß man aus der Eignung eines Polysaccharids irgendwelcher Art als Kohlenstoffquelle noch nicht den Rückschluß ziehen darf, daß der betreffende Organismus auch die passenden hydrolytischen Fermente enthält. Eine direkte Oxydation ohne Spaltung ist nicht nur möglich, sondern voraussichtlich durchaus nicht selten.[2]) Fermentativ hat sich der Umsatz der Kohlenhydrate bisher mit einer Ausnahme, der Vergärung durch das Hefeferment, die Zymase, nur hydrolytisch realisieren lassen. Wir behandeln daher die Hydrolyse durch Fermente in einem getrennten Kapitel. Die sonstige Anordnung folgt dem Prinzip, daß wir von den komplizierteren zu den einfacheren Kohlenhydraten durchdringen.

Abbau der Zellulose.[3])

Als Zellulose bezeichnen wir hier nur die echte Zellulose, das heißt das Polysaccharid, welches bei der Säurehydrolyse keine anderen Zuckerabbauprodukte als Glukose liefert. Das sei in Anbetracht der Gewohnheit in botanischen Büchern, auch andere Wandsubstanzen als Zellulose zu bezeichnen, ganz besonders hervorgehoben. Auch die als Hemizellulosen be-

---

[1]) Vgl. hierzu *E. Pringsheim,* dieses Handbuch, Bd. V, Teil 2, wo sich auch einiges speziell für Mikroorganismen brauchbare findet.

[2]) Vgl. hierzu *H. Pringsheim* und *G. Zemplén*, Studien über die Polysaccharide spaltenden Fermente in Pilzpreßsäften. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 62 (1909). 367.

[3]) Bezüglich der Zellulosebestimmungs-Methoden vgl. dieses Handbuch, Bd. V, Teil 1, S. 382.

zeichneten Substanzen, wie Galaktan, Paraban etc., die Komplexe anderer Zucker sind, können uns hier nicht beschäftigen. Sie konnten bisher nicht in reinem Zustande erhalten werden, und ihre Zerlegung durch Mikroorganismen ist noch wenig erforscht.[1]) Die Pektingärung hat zwar eine eingehendere biologische Bearbeitung gefunden. Die Tatsache, daß die chemische Zusammensetzung dieser komplizierten Produkte noch recht unklar ist und daß auch ihr für die Gewinnung der Gespinstfaser so wichtiger mikrobiologischer Abbau bisher zu keinen einheitlichen Produkten führte, hindert uns hier auf die Pektingärung einzugehen.[2])

Die echte Zellulose gehört zu den resistentesten Kohlenstoffmaterialien der Natur. Es ist sehr fraglich, ob sie überhaupt durch höhere Lebewesen ohne Mitwirkung von Mikroorganismen abgebaut werden kann. Das schließt nicht aus, daß sie in Gestalt ihrer Abbauprodukte und der Zwischenstufen ihres Abbaues auch im Tierkörper als Ernährungs- und Energiematerial eine Rolle spielt. Denn auch hier können diese Produkte in den Stoffwechsel gerissen werden, ebenso wie sie stickstoffbindenden Bakterien als Energiematerial dienen können.[3])

Die Zellulose kann durch anaerobe Bakterien und aerob durch Schimmelpilze und Bakterien zerlegt werden.

1. Erreger der Methan- und Wasserstoffgärung der Zellulose.

Die Isolierung dieser beiden Formen von Zellulosevergärern wurde von *Fuhrmann* S. 1320 beschrieben. Pferdemist eignet sich am besten zur Infektion. Doch kann ein solcher Versuch auch fehlschlagen, da nicht jeder Pferdemist Kulturen der Zellulosezersetzer gibt. Die Trennung der Methan- und Wasserstoffvergärer ist nicht immer mit der von *Omelianski* geschilderten Sicherheit durchzuführen. Man kann die Wasserstoffbakterien noch durch schwach alkalische Reaktion mit Sodazusatz begünstigen.

Die Stoffwechselprodukte sind Methan, Wasserstoff und Kohlensäure, die gasanalytisch zu trennen sind, und ein Gemisch von Fettsäuren. Bezüglich ihrer Bestimmung und Trennung sei auf meine Ausführungen im II. Bd., S. 20 verwiesen.

2. Zersetzung der Zellulose durch denitrifizierende Bakterien.[4])

Eine Flasche von 200 *cm*³ Inhalt wird mit einer Mischung von:

Leitungswasser . . .	100	KNO_3	0·25
Papier	2	K_2HPO_4	0·05

[1]) Vgl. *H. C. Schellenberg,* Untersuchungen über das Verhalten einiger Pilze gegen Hemizellulose. Flora. Bd. **98** (1908). S. 257.

[2]) Vgl. *J. Behrens,* Die Pektingärung, in *Lafar,* Handb. d. techn. Mykologie. Bd **3.** S. 269.

[3]) Vgl. hierzu die Zusammenfassung *H. Pringsheim,* Die Bedeutung stickstoffbindender Bakterien. Biologisches Zentralblatt. Bd. **31** (1911). S. 65.

[4]) *G. van Iterson jun.,* Die Zersetzung der Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakteriologie. II. Abt. Bd. **9** (1904). S. 689; Okologie, S. 182.

gefüllt und mit einigen Kubikzentimetern Kanalwasser, dem etwas Grabenmoder hinzugefügt wurde, geimpft und der Stöpsel lose aufgesetzt. Bei 35° kultiviert, setzt nach 8 Tagen Gärung ein, die sich bald verstärkt. Unter starkem Schäumen wird das Papier an die Oberfläche getrieben, wo es vom Stopfen zurückgehalten wird. Nach etwa 2 Wochen ist das Nitrat völlig verschwunden. Gießt man jetzt vom Papier ab, das schon Anzeichen der Zersetzung zeigt, und füllt mit neuer Nährlösung auf, so setzt der Dentrifikationsprozeß schon nach wenigen Tagen in völliger Stärke ein. Allmählich kann man so das ganze Papier zum Verschwinden bringen. Das Nitrat geht bei dem Vorgang in kohlensaures Kali über, das die Fortführung des Prozesses hemmt, wenn man es nicht durch Abgießen vom Papier entfernt. Produkte des Zellulosezerfalls sollen nur freie Kohlensäure und kohlensaures Salz sein. Doch ist der Abbau noch wenig erforscht. Die Bakterien, welche hier wirksam sind, wurden bisher nicht in Reinkulturen erhalten.

3. Aerober Zellulosezerfall.

Da die Produkte dieses Abbaues noch unerforscht sind, seien hier nur die Anhäufungsmethoden der in Frage kommenden Mikroorganismen gegeben:

1. Anhäufung aerober Bakterien.

Leitungswasser . .	100	Kultur in Erlenmeyerkolben in einer Flüssigkeitsschicht von 0·5—1 *cm* Infektionsmaterial Grabenmoder. Nach 5—6 Tagen kräftiges Wachstum,
Papier	2	
NH_4Cl	0·1	
K_2HPO_4	0·05	
Kreide	2	

nach 3—4 Wochen wird die Zellulose schleimig. Beim Überimpfen in neues Kultursubstrat geht der Prozeß eher noch schneller von statten.

2. Anhäufung von Zellulose zersetzenden Schimmelpilzen.

In einer Petrischale werden zwei Scheiben Filtrierpapier mit folgender Lösung angefeuchtet: Leitungswasser 100, NH_4NO_3 0·05, KH_2PO_4 0·05, zwölf Stunden offen stehen gelassen. Man kultiviert bei 24° und hält das Papier dauernd feucht. Nach 14 Tagen bis 3 Wochen erhält man eine reichliche Entwicklung einer sehr verschiedenartigen Flora von Schimmelpilzen, die die Zellulose in mehr oder weniger sichtbarer Weise zersetzen. Man kann die Schimmelpilze in Reinkulturen gewinnen und sie dann auf steriles Papier zurückübertragen. Bei genügend langer Dauer kann durch sie das ganze Papier aufgezehrt werden. Auch die Holzpilze, wie Merulius- und Polyporus-Arten, sind imstande, die Zellulose zu zersetzen und restlos aufzuzehren.

Hydrolytischer Abbau der Polysaccharide.

I. Stärke.

Stärke ist für zahlreiche Mikroorganismen eine geeignete Kohlenstoffquelle. Ob sie vor der Ausnutzung als solche immer verzuckert wird, ist fraglich. Jedenfalls sind aber viele Schimmelpilze und Bakterien im Besitze des Stärke spaltenden Fermentes, das Hefen mit wenigen Ausnahmen nicht besitzen. [1]) Die Diastasebildung findet häufig auch in Abwesenheit von Stärke statt. Überhaupt ist die Absonderung stärkelösender wie ganz allgemein zuckerspaltender Fermente ein von der Ernährung, auch von der Stickstoffquelle abhängiger, sehr variabler Faktor. [2])

1. Anhäufung von Diastase erzeugenden Mikroorganismen. [3])

Die folgende Nährlösung wird z. B. mit Erde beimpft:

Leitungswasser . .	1000	
Kartoffelstärke . .	0·2	
Stickstoffquelle . .	0·05	(Pepton, Kasein, Salpeter, Ammoniumchlorid)
K_2HPO_4		Spuren.
$MgSO_4$		
$FeCl_3$		

Es wird in dünner Schicht aerob bei 30, 37 oder 45° kultiviert und nach Verschwinden der Jodreaktion in dieselbe, nun sterilisierte Nährlösung abgeimpft. Nach drei bis vier Abimpfungen werden Kulturen erhalten, die fast keine anderen Arten als Diastasebakterien enthalten. Die Art der gewonnenen Flora ist naturgemäß von den Zufällen des Impfmaterials, sonst aber auch von der Stickstoffnahrung abhängig.

2. Nachweis Diastase erzeugender Pilze in Bodenproben. [3])

Folgender Nährboden gestattet die Zählung stärkelösender Mikroorganismen:

[1]) Vgl. die Zusammenstellung bei *W. Kruse*, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig. F. C. W. Vogel. 1910. S. 214.

[2]) Vgl. *H. Pringsheim*, Die Variabilität niederer Organismen. Kap. XIII. Die Regulation der Fermentwirkung und die Mobilisierung neuer Fermente. Julius Springer. Berlin 1910.

[3]) *E. de Kruyff*, Bulletin du département de l'agricultur aux Indes néerlandaises, Nr. III. Mikrobiologie. I. 1906. Ökologie. S. 231.

Leitungswasser	1000	Die mit diesem Agar hergestellten und besähten Platten zeigen bei Wachstum stärkelösender Formen eine Aufhellung der trüben Platte. Durch Aufgießen von Jodlösung kann man die Erscheinung noch deutlicher machen, da die Kolonienzone im inneren ungefärbt bleibt, nach außen rote Dextrinreaktion zeigt, der Agar sonst aber blau wird.
Kartoffelstärke	15	
Stickstoffquelle	1	
K_2HPO_4	0·5	
$MgSO_4$, $FeCl_3$	Spuren	
Agar	15—20	

3. Spezielle Methoden des Diastasenachweises bei Mikroorganismen.

a) Bei stärkerer Diastasebildung.

Die Methode von *Eijkmann* [1]) unterscheidet sich nicht wesentlich von der zum Nachweis diastasebildender Pilze zu verwendenden eben angeführten. Die Platten werden hier durch Mischen mit gequollenem Amylum oryzae oder Amylum maranthae hergestellt. Das Verfahren ist sonst das gleiche.

b) Bei schwacher Diastaseproduktion (Leuchtbakterien als Reagenz auf geringe Diastasemenge). [2])

Ein gut ausgekochtes Gemisch von Meerwasser mit 8% Gelatine, 1% Pepton und 0·25% Kartoffelstärke wird mit Photobacterium phosphorescens und ein anderer Teil mit Ph. Pflügeri beimpft. Dann wird in Platten gegossen, die bald ihre Leuchtkraft verlieren, da die Bakterien die Stärke nicht spalten können. Tupft man auf die Platten Diastasepräparate, so bemerkt man bei der ersten Bakterienart stark aufleuchtende Flecken, nicht jedoch bei der zweiten Form. Das Ph. phosphorescens soll deshalb außerordentlich geringe Spuren von Diastase anzeigen, da es bei Zuführung von Maltose, die aus der Stärke durch die Diastase gebildet wird, Leuchterscheinung zeigt. (Die Methode hat auch für andere zuckerspaltende Fermente Anwendung gefunden; ich werde jedoch auf sie wegen ihrer geringen Verläßlichkeit nicht mehr zurückkommen.)

Für quantitative Diastasebestimmungen dürfte auch hier die Methode von *Wohlgemut* [3]) in Frage kommen.

---

[1]) *C. Eijkmann*, Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Zentralbl. f. Bakteriologie. I. Abt. Bd. **29** (1901). S. 841.

[2]) *M. Beijerinck*, Over lichtvoedsel en plastisch voedsel van Lichtbakterien. Akad. v. Wetenschappen. Afd. Naturerk. 2de Reeks. Deel VII. 1890. Ref. *Kochs* Jahresbericht für Gärungsorganismen. Bd. I (1890). S. 180.

[3]) *Wohlgemut*, Methode zur quantitativen Bestimmung des diastatischen Fermentes. Biochem. Zeitschr. Bd. **9** (1908). S. 1. Vgl. dieses Handbuch. Bd. V. Teil 1. S. 405.

II. Dextrine.

Dextrine werden von einigen Saccharomyzeten gespalten und vergoren, ohne daß ihnen die Fähigkeit, Stärke zu hydrolysieren, zukommt (vgl. *Kruse*, S. 222). Durch diese Tatsache wird die Theorie gestützt, daß zur Spaltung der Stärke in Maltose mehrere Fermente nötig sind. Besonders interessant ist nun, daß es auch Bakterien geben soll, die aus Stärke Dextrine abspalten, welche sogar in kristallisiertem Zustand gewonnen werden konnten.

Da die Untersuchung dieser neuen Produkte noch wenig ausgebildet ist — vor allem fehlt die Bestimmung ihres Molekulargewichts — sei ihre Darstellung hier beschrieben. Es handelt sich um eine von *Schardinger*[1]) entdeckte Bakterienart, den Bac. macerans, der sich durch seine Azetonproduktion auch in anderer Richtung auszeichnet.

Darstellung kristallisierter Dextrine.[2])

Nährlösung: 200 *g* Stärke verkleistert in 4 *l* Wasser, 4 *g* phosphorsaures Ammon, 1 *g* Magnesiumsulfat, wenig Kochsalz. Die sterile Lösung wird mit 3—4 Kartoffelkeilen (vgl. *Fuhrmann* 1214), auf denen sich der Bac. macerans binnen 4—5 Tagen bei 45° entwickelt hat, beimpft. Der Kartoffelkleister wird bereits nach 3—4 Stunden leichter beweglich und ist innerhalb 10—12 Stunden zu einer in geringem Grade opalisierenden Flüssigkeit gelöst. Bei Maranta-, Reis- oder Weizenstärke wird der Kleister auch bald beweglich, es tritt aber dann eine Ausflockung ein, wobei zuerst ein schwammiger poröser Kuchen durch die Gasbildung an die Oberfläche gehoben wird. In den ersten Tagen tritt immer Schäumen und Geruch nach Azeton auf. Je länger der Versuch dauert, um so wässeriger wird der Kleister und um so stärker wird *Fehling*sche Lösung reduziert.

Vorprüfung des Filtrates: Man fügt zu 10—15 cm^3 der filtrierten Lösung so lange Jodlösung (Jod-Jodkalium oder alkoholische Jodlösung), bis die anfangs schwindende rote bis blauviolette Färbung erhalten bleibt. Beim Aufbewahren im kühlen Raum bilden sich am Rande der Flüssigkeit und entlang dem Boden der Eprouvette graugrüne Nädelchen, die mikroskopisch untersucht, an den Kreuzungsstellen blaue Flecke zeigen.

Gewinnung der kristallisierten Dextrine als Rohprodukte: Das genau mit Natronlauge neutralisierte Filtrat wird auf 800—900 cm^3 eingeengt, gekühlt und mit Äther bis zur Sättigung versetzt bei 5° aufbewahrt. Der ausfallende, Schwimmsand ähnliche Bodensatz wird dann abgenutscht und das Filtrat mit Chloroform durchgeschüttelt wieder in der Kälte stehen gelassen. Der hierbei ausfallende Niederschlag wird mit dem

[1]) *F. Schardinger*, Über die Bildung kristallisierter, *Fehling*sche Lösung nicht reduzierender Körper (Polysaccharide) aus Stärke durch mikrobielle Tätigkeit. Zentralblatt f. Bakteriol. II. Abt. Bd. 22 (1901). S. 98.

[2]) *F. Schardinger*, Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Mikrobien. Zentralbl. f. Bakteriol. II. Abt. Bd. **24** (1911). S. 188.

ersten vereint. Die Dextrine bilden mit Äther und Chloroform lockere (durch Wasser zersetzbare), in der Kälte schwer lösliche Verbindungen. Ausbeute der lufttrockenen Rohsubstanz 25—30% der Stärke.

Trennung der kristallisierten Dextrine: Das Rohprodukt wird in kochendem Wasser gelöst und durch einen Warmwassertrichter filtriert. Nach dem Erkalten wird vom kristallisierten Dextrin β abgegossen. Dieses wird mit Wasser gewaschen und daraus mehrfach umkristallisiert. Es bildet dabei zu Drusen vereinigte, rhombische Kristalle von der spezifischen Drehung in 1%iger Lösung $\alpha(D) = +136^{\circ}$. Im Ölbade tritt bei 260° C Sintern unter allmählicher Zersetzung ein. Die getrocknete Substanz analysierte zu $C_6H_{10}O_5$. Bei der Säurehydrolyse geht sie in Traubenzucker über.

Dextrin α. Die abgegossene, von einem feinen Schlamm filtrierte Mutterlauge wird zuerst mit etwas Alkohol versetzt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach nochmaliger Filtration wird mit viel Alkohol versetzt, worauf sich ein weicher, weißer, voluminöser kristallisierter Niederschlag bildet, der aus feinen, sechsseitigen, prismatischen Täfelchen mit meist ungleich ausgebildeten Seitenkanten besteht. Drehung der bei 100° getrockneten Substanz in 1%iger wässeriger Lösung $\alpha(D) = +144^{\circ}$. Lufttrocken enthält die Substanz ½ Mol. Kristallalkohol, die bei 100° getrocknete Substanz analysierte auch zu $C_6H_{10}O_5$. Bei der Säurehydrolyse wird auch Glukose gebildet.

Beide Dextrine reduzieren *Fehling*sche Lösung nicht. Sie werden von Unter- und Obergärhefe nicht vergoren und durch „Maltin" nicht gespalten. Weitere Untersuchungen sind sehr erwünscht.

III. Tri- und Disaccharide.

1. Die Art des Abbaus.

Die kristallisiert erhaltenen Trisaccharide und Disaccharide werden durch die hydrolytischen Fermente niederer Organismen in ihre Komponenten gespalten. Auch Tetrasaccharide können so zerlegt werden; doch ist ihr Abbau noch weniger eingehend erforscht. Die Literatur über diese Fermente findet sich bei *Neuberg* und *Rewald*.[1]) Angaben über Bakterieninvertase und -laktase auch bei *Fuhrmann*.[2])

Viele in der Literatur vorhandene Daten beruhen nur auf dem Nachweis einer Assimilation durch Mikroorganismen, wenn die Zucker als Kohlenstoffquelle geboten werden. Doch sei vor einer derartigen Beweisführung nochmals gewarnt, weil, wie schon hervorgehoben, Ausnutzung auch ohne vorherige Spaltung erfolgen kann. Über die Art der Spaltung gibt am besten Aufschluß die Osazonprobe *E. Fischers*. Bisher wurden derartige Versuche nur mit Hefen und Schimmelpilzen ausgeführt. Vergleiche hierzu meine Ausführungen im II. Bande dieses Handbuches, S. 192. Was die Ab-

---

[1]) In *Abderhalden*, Biochemisches Handlexikon. Bd. II. S. 388—437. Julius Springer. Berlin 1911.

[2]) *Fuhrmann*, Vorlesungen über Bakterienenzyme. S. 90. Jena. G. Fischer. 1907.

trennung der Fermente anbetrifft, so hat die *Buchner*sche Preßsaftmethode ihre Versprechungen nicht ganz gehalten, da bisweilen einzelne Fermente nicht in den Saft übergehen, sondern im Preßkuchen zurückgehalten werden.[1]) Man verwendet deshalb einfacher die feuchten Mikroorganismen als solche, die man auf die 10%igen Zuckerlösungen in Gegenwart von Toluol 48 Stunden bei Bruttemperatur einwirken läßt. Die von den Mikroorganismen durch Filtration z. B. über Kieselguhr befreite Lösung wird mit 1 *g* kristallisiertem Natriumazetat pro 1 *g* verwandten Zucker versetzt, auf dem Wasserbade erwärmt und nach Zusatz von wenig reiner Tierkohle filtriert. Durch diese Operation werden die Proteine zum größten Teil entfernt. Dem klaren Filtrat wird auf ein Teil Zucker 2 Teile Phenylhydrazinchlorhydrat (das durch Umkristallisieren aus Alkohol reinweiß erhalten wird) und 3 Teile kristallisiertes Natriumazetat zugegeben und im Wasserbade, d. h. direkt im kochendem Wasser $1^1/_2$ Stunden erhitzt. Nach einstündigem Stehen in der Kälte werden die Osazone abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und mit etwa 40 Teilen Wasser (auf den Zucker berechnet) ausgekocht, kochend heiß filtriert und mit wenig heißem Wasser gewaschen. Hierbei verbleiben auf dem Filter, wenn Spaltung eingetreten ist, bei Maltose und Zellobiose Glukosazon, bei Milchzucker und Melibiose ein Gemisch von Glukosazon und Galaktosazon, endlich bei Raffinose, je nach der Spaltung, die z. B. bei Schimmelpilzen in verschiedener Richtung erfolgen kann[1]), Glukosazon, Galaktosazon oder ein Gemisch dieser beiden, wenn nämliche Spaltung in die drei Monosaccharide eingetreten ist. Spaltung in Fruktose und Melibiose gibt sich hier dadurch zu erkennen, das nach dem Auskochen der Osazone im Filtrat Melibiosazon ausfällt. Außerdem werden die unlöslichen Osazone aus 50%igem Alkohol umkristallisiert und durch ihren Zersetzungspunkt geprüft, ob Glukosazon oder Galaktosazon vorlag.

Die in heißem Wasser unlöslichen Osazone kann man nach dem Trocknen bei 100° zur Wägung bringen; ihre Menge ermöglicht eine annähernde Beurteilung des Grades der Spaltung.

2. Der Grad des Abbaues.

Quantitativ läßt sich die Spaltung mit einiger Leichtigkeit nur beim nicht reduzierenden Rohrzucker verfolgen.[2]) Handelt es sich um die Spaltung reduzierender Disaccharide in reduzierende Monosaccharide, so muß man sich zur Verfolgung des Spaltungsgrades durch die Reduktionskraft einer empirisch zusammengestellten Tabelle bedienen, da das Reduktionsvermögen durch die Anwesenheit verschiedener reduzierender

[1]) *H. Pringsheim* und *G. Zemplén*, Studien über die Polysaccharide spaltenden Fermente in Pilzpreßsäften. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **62** (1909). S. 367.

[2]) Vgl. *Tollens*, Dieses Handbuch. Bd. II. S. 145. Genauere Angaben in *E. v. Lippmann*, Chemie der Zuckerarten. Bd. I. S. 936. Braunschweig. Vieweg & Sohn. 1904.

Zucker zu stark gegenseitig beeinflußt wird, um aus der Reduktion auf theoretischem Wege das Zuckerverhältnis zu berechnen. So verfahren *Bertrand* und *Holderer*[1]) bei ihrer Untersuchung der Zellobiose, wobei sie die Reduktion nach der *Bertrand*schen Methode (dieses Handbuch, Bd. II, S. 181) bestimmten. Eine derartige empirische Tabelle für die Bestimmung des Grades der Spaltung von Zellobiose in Traubenzucker sei hier gegeben.[2])

Bei Anwendung von 50 *mg* Zellobiose findet man

auf	0	*mg*	hydrolysierte	Zellobiose	67·7	*mg* Cu.
„	5	„	„	„	72·6	„ „
„	10	„	„	„	77·5	„ „
„	15	„	„	„	80·75	„ „
„	20	„	„	„	84·0	„ „
„	25	„	„	„	86·95	„ „
„	30	„	„	„	89·9	„ „
„	35	„	„	„	92·8	„ „
„	40	„	„	„	95·7	„ „
„	45	„	„	„	97·85	„ „
„	50	„	„	„	100·0	„ „

mit einer Genauigkeit von 2—4%.

Gärungen der Kohlenhydrate.

I. Die alkoholische Gärung.

Die Fähigkeit, die Zucker zu Alkohol und Kohlensäure zu vergären, kommt neben der Hefe, dem wichtigsten Gärungsorganismus, noch einigen Schimmelpilzen, Allescheria Gayonii, Mucor javanicus, Mucor racemosus etc., einigen Monilia- und Torulaarten zu. Auch einige Bakterien bilden aus Zucker Äthylalkohol, jedoch als Nebenprodukt.[3]) Der Vergärung von Polysacchariden durch die Zymase muß immer erst eine Spaltung in die Monosaccharide vorangehen; verschiedene Hefen verhalten sich verschiedener Polysacchariden bezüglich ihrer Gärfähigkeit sehr verschieden. Angaben über die Assimilierbarkeit durch verschiedene Klassen von Saccharomyzeten finden sich in Bd. III, S. 1260. Doch darf auch hier Assimilierbarkeit und Gärfähigkeit nicht ohne weiteres in Parallele gesetzt werden. Von den Hexosen werden nur die in der Natur vorkommenden d-Komponenten der Glukose, Mannose, Fruktose und Galaktose vergoren, und zwar ist jede Hefe, die einen der drei erst genannten Zucker vergärt, auch imstande, die anderen zu vergären. Der Mechanismus der Zuckerspaltung soll in allen

---

[1]) *G. Bertrand* et *M. Holderer*, Recherches sur la cellase, nouvelle diastase dedoublant le cellose. Bull. de la Soc. chimique de France. (4). T. 7 (1910). p. 177.

[2]) Privatmitteilung von *G. Bertrand*.

[3]) Literatur bei *Oppenheimer*, Die Fermente. Bd. II, S. 452. Leipzig, F. C. W. Vogel. 1910.

drei Fällen der gleiche sein.[1]) Galaktose wird langsamer vergoren, doch kann Hefe an die Vergärung dieses Zuckers angepaßt werden.[2]) Auch Glyzerinaldehyd und Dioxyazeton, die als Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung angesprochen werden, sind nach neuesten Untersuchungen durch Hefe vergärbar.[3])

Bezüglich der Reinkultur von Hefen vergleiche man *Fuhrmanns* Angaben. Die Isolierung aus Naturprodukten ist weniger schwierig als die Identifizierung der verschiedenen Hefearten und Rassen. Die Lösung dieser Frage muß im allgemeinen sehr geübten Spezialisten überlassen werden. Angaben hierüber, z. B. auch über die Verwendung der Riesenkolonien für diesen Zweck finden sich bei *P. Lindner*, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. Paul Parey. 1909. Fünfte Auflage. Zur Lösung von Stoffwechselfragen verschafft man sich am besten die fertigen Reinkulturen. Man impft aus ihnen nicht direkt in die zu untersuchenden Lösungen, sondern man frischt die Hefen erst durch eine Züchtung in Maische bei Bierhefen, oder Rosinenmost bei Weinhefen, auf, ehe man sie in die Nährsubstrate einimpft. Bei Vergleichsresultaten muß die Hefe aus einer in kräftiger Gärung befindlichen Kultur, also nach ein paar Tagen, etwa 4—5, entnommen werden. Am besten impft man natürlich Vergleichskulturen aus derselben Flüssigkeit. Bei Schimmelpilzen kommt man durch Übertragung geringer Myzelteile weit schneller zu Kulturen als durch Abimpfen von Sporen, die erst auskeimen müssen. Auch das ist bei Vergleichen des Wachstums und der Gärung sehr in Betracht zu ziehen. Die geringen Unterschiede in der Größe der übertragenden Myzelmenge, die man mit der Platinöse herausfischt, spielen keine Rolle, da sie sich durch Wachstum schnell ausgleichen. Hefen kann man in tiefer Schicht, also in zu $^3/_4$ vollen Erlmeyerkolben kultivieren, luftbedürftige Schimmelpilze besser in dünner, $1—1^1/_2$ *cm* dicker Schicht.

Einen sehr großen Einfluß auf die Gärkraft hat auch die Zusammensetzung des Nährbodens in anderer als den Zucker betreffender Richtung. Von Nährsalzen bietet man im allgemeinen in Form der angegebenen Salze einen Überschuß. Der Haupteinfluß kommt der Stickstoffnahrung zu, auf die im Kapitel Eiweißstoffwechsel eingegangen werden wird.

Gärungsnachweis.

Bei stark gärenden Hefen läßt sich das Auftreten der alkoholischen Gärung schon durch das Schäumen erkennen. Bei gärenden Schimmelpilzen ist diese Beobachtung schon weit weniger zuverlässig. Man muß hier also

[1]) Vgl. *E. F. Armstrong*, The Simple Carbohydrates and the Glucosides. p. 52. Longmann, Green & Co. London 1910.

[2]) *Arthur Harden*, Alcoholic Fermentation. p. 109. Longmann, Green & Co. London 1911.

[3]) *Buchner* und *Meisenheimer*, Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. IV. Mitteilung. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 43 (1910). S. 1773.

den Alkohol[1]) oder die Kohlensäure nachweisen. Bei geringen Zuckermengen kann man sich zum Gärungsnachweis einer Methode im hohlen Objektträger bedienen. Doch haftet dieser Methodik eine gewisse Gefahr an, die vielleicht nicht so sehr durch die Beobachtung wie durch die Tatsache gegeben ist, daß man im Besitze nur geringer Substanzmengen meist keine große Garantie für ihre Reinheit leisten kann. Die jedenfalls zu Vorversuchen geeignete Methode sei hier immerhin beschrieben.

Gärungsnachweis im hohlen Objektträger.[2])

Die Zuckerarten werden fein pulverisiert, so daß man ohne Schwierigkeit aus dem betreffenden Gläschen annähernd gleich große Prisen mit einem etwas breitgeklopften Platindraht entnehmen kann. Als Gärgefäß dient ein hohler Objektträger, dessen Höhlung mit einem Deckgläschen bedeckt wird, nachdem vorher ein oder zwei Tropfen steriles Wasser oder Hefewasser mit milchig fein verteilter Hefe zugegeben und mit einer kleineren Prise der betreffenden Zuckerarten vermischt wird.

Wichtig ist, daß man die Flüssigkeit so abmißt, daß das Deckglas über die Flüssigkeit geschoben werden kann, ohne daß Luftblasen darunter bleiben oder die Flüssigkeit zu stark unter den Rändern des Deckgläschens hervorquillt. In diesem Falle muß man den Überschuß mit sterilem Filtrierpapier absaugen, sonst würde der Vaselinring, der um das Deckglas gezogen wird, nicht dicht halten.

Bei 25° zeigt sich spätestens am nächsten Morgen, ob Gärung eingetreten ist oder nicht. In letzterem Falle erscheint das Präparat durchaus unverändert, nur daß die Hefe als gleichmäßiger dichter Schleier die untere Wand der Höhlung bedeckt. Um sicher zu gehen, empfiehlt sich auch ein Anwärmen über der Flamme. Ist auch nur eine schwache Gärung vorhanden gewesen, so treten zahlreiche Kohlensäurebläschen auf. Bei lebhafter Vergärung ist fast die ganze Höhlung von einer großen Luftblase ausgefüllt, unterhalb der die Hefe feuchtbreiig daliegt. Das Vaselin hat zum Teil bei der Hebung des Deckgläschens nachgegeben und sich unter dasselbe gezogen. Um nachzuweisen, daß die Luftblase in der Hauptsache aus Kohlensäure besteht, braucht man bloß seitlich ein Paar Tropfen Lauge zufließen zu lassen, worauf die Blase bis auf einen kleinen Rest zusammenschrumpft. Am besten ist es, sämtliche zu prüfende Zuckerarten erst gegen ein und dieselbe Hefe zu untersuchen, weil man so an der Größe der Blasen eine Kontrolle für die Gärungsintensität besitzt. Bei der kurzen Versuchsdauer braucht auf sterile Handhabung kein Wert gelegt zu werden.

---

[1]) Bezüglich des Alkoholnachweises und der quantitativen Bestimmung vgl. Bd. VI. S. 1.

[2]) *Paul Lindner*, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. Paul Parey. 1909.

Geschwindigkeitsmessung der alkoholischen Gärung.

Häufig ist es von Wert, die Schnelligkeit der alkoholischen Gärung bei wechselnden Bedingungen, z. B. verschiedenen Zuckerarten, verschiedenen Konzentrationen und bei anderen Einflüssen, wie bei verschiedener Stickstoffernährung, zu verfolgen. Hier in jedem Falle den Alkoholgehalt zu ermitteln wäre zu umständlich. In einfacher und bei größeren Flüssigkeitsmengen durchaus nicht ungenauer Weise kann das durch den infolge Kohlensäureabgabe auftretenden Gewichtsverlust geschehen, da ja auf 1 Teil Kohlensäure 1·04 Teile Alkohol gebildet werden. Man verwendet etwa 250 cm^3 Nährlösung und wägt auf einer Wage, die noch 0·1 g genau anzeigt.[1]) Die Gärflaschen werden mit einem Güraufsatz (vgl. Fig. 225) versehen, der mit einer Mischung von 5 Teilen Wasser und 7 Teilen konzentrierter Schwefelsäure gefüllt wird. Diese Mischung hält Wasser in genügender Weise zurück, ohne daß sie aus der Atmosphäre bei der Versuchsanstellung wägbare Wassermengen anziehtn.

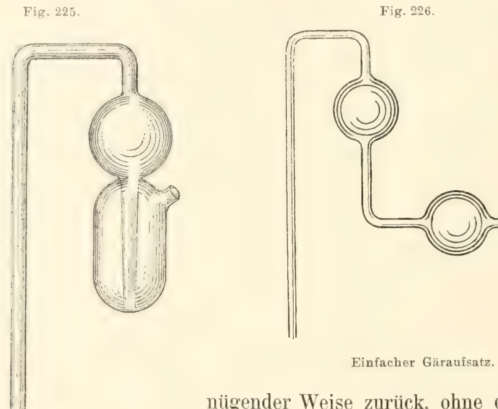


Fig. 225. Güraufsatz.

Fig. 226. Einfacher Güraufsatz.

Will man zahlreiche Vergleichsversuche anstellen und sind einem die Güraufsätze zu teuer, so kann man sich auch durch ein Zweikugelsystem folgender Konstruktion helfen, das pro Stück beim Glasbläser nur 10 Pf. kosten darf (Fig. 226).

Genauere Beobachtungen kann man durch Überführung der Kohlensäure in einen mit Quecksilber gefüllten *Schiff*schen Azotometer machen.[2]) Will man den Gärverlauf innerhalb einer kurzen Periode, also un-

[1]) Vgl. *H. Pringsheim,* Über die Stickstoffernährung der Hefe. Biochem. Zeitschrift. Bd. 3 (1907). S. 161.

[2]) Vgl. hierzu *Harden, Thompsen* und *Young,* Apparatus for the collection of gases evolved in fermentation. Biochem. Journ. Bd. 5 (1910). S. 230.

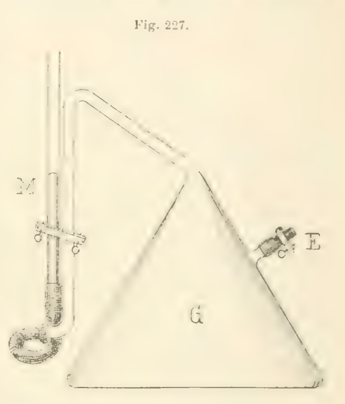
abhängig von der Konzentrationsänderung des Zuckers bestimmen, so mißt man ihn am Druck der ausgeschiedenen Kohlensäure.

Für diesen Zweck haben *Iwanoff*[1]) und *Slator*[2]) besondere Apparate beschrieben, von denen einer[1]) hier wiedergegeben sei.

Apparat zur Verfolgung des Gärverlaufes durch Druckmessung.

Er besteht aus einem konischen, dickwandigen Kolben (vgl. Fig. 227), dessen Bodendurchmesser 11·5 *cm* und dessen Höhe 12·5 *cm* beträgt. Der obere Teil ist in eine ebenfalls dickwandige Röhre ausgezogen, die nach unten abgebogen mit einer rechtwinkeligen Biegung endet. Auf diesem Ende wird eine dickwandige Gummiröhre mit einer geraden Glasröhre aufgesetzt und durch einen Schraubenquetschhahn mit Vorrichtung zum Öffnen an der Kolbenröhre befestigt. Auf die kurze Seitenröhre des Kolbens wird ein durch einen Quetschhahn verschiebbarer Gummischlauch aufgesetzt. Die gärende Flüssigkeit wird nun durch einen in diese Röhre eingestellten Trichter in den Kolben eingegossen, so daß sie eine dünne Schicht auf dem Boden bildet, wodurch ein leichter und gleichmäßiger Gasaustritt aus der Flüssigkeit bezweckt wird. Danach wird die Manometerröhre mit Quecksilber gefüllt, die Füllröhre verschlossen und der Druck nach Schütteln mit Hilfe eines auf eine Glasscheibe aufgetragenen Maßstabes an der Differenz der Quecksilbersäulen abgelesen. Nach Beendigung des Versuches läßt sich die ganze Anordnung leicht auseinandernehmen und reinigen. Bei genauen Messungen ist es nötig, das Volumen auf das anfängliche zu reduzieren; hierzu bringt man durch Heben eventuell Senken der beweglichen Röhre das Quecksilber in der unbeweglichen Standröhre zur anfänglichen Höhe.

Fig. 227.



Apparat zur Verfolgung des Gärverlaufes durch Druckmessung.

Die Empfindlichkeit dieses Apparates wird durch seinen Rauminhalt bestimmt und kann daher in weiten Grenzen variiert werden. Bei einem Inhalt von 380—390 *cm*³, der den angegebenen Maßen entspricht, muß die Ausscheidung von 1 *cm*³ Gas eine Druckerhöhung auf $\frac{760}{380}$ Atmosphären,

[1]) *Leonid Iwanoff*, Ein neuer Apparat für Gärungsversuche. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **24** (1909). S. 429.

[2]) *A. Slator*, Studies in fermentation. Part I. The chemical dynamics of alcoholic fermentation by yeast. Journ. of the Chem. Soc. Vol. **89** (1906). p. 128.

d. h. $\frac{1}{760}$ = 2 *mm* der Quecksilbersäule hervorrufen. Da der Rauminhalt verschiedener Kolben nur um 5—10 cm^3 abweichen konnte, so betrug die Differenz der Manometerablesungen während eines Versuches bei gleicher Druckzunahme nicht mehr als 0·5—1 *mm* bei einem Überdruck von 30 bis 40 *mm*.

Bei einer solchen Empfindlichkeit des Apparates müßte man natürlich eine Korrektion auf Temperatur und Druck in Rechnung ziehen, wenn man die absoluten Gasmengen zu bestimmen hätte, was am bequemsten durch Beobachtung eines Kontrollmanometers mit einer entsprechenden Lösungsmenge erzielt werden könnte. Die Hauptbedeutung des Apparates besteht aber nicht in der Bestimmung absoluter, sondern relativer Mengen ausgeschiedener Gase. Bezüglich der Selbstregistrierung an dem Apparate vgl. man das Original.

Das Ferment der alkoholischen Gärung.

Die fermentative alkoholische Gärung durch Hefepreßsaft oder Dauerhefepräparate kann natürlich auf ganz dieselbe Weise verfolgt werden, wie eben angegeben wurde. Eine Abtrennung des Fermentes von Schimmelpilzen ist bisher noch nicht oder jedenfalls sehr unvollkommen gelungen.[1])

Die Darstellung des Hefepreßsaftes und der Azetondauerhefe wurde schon im Bd. II, S. 195 beschrieben. Eine Abbildung der hierzu nötigen hydraulischen Presse findet sich in Bd. I, S. 113, Fig. 228. Auch die Funktion der Phosphate bei der alkoholischen Gärung[2]), die jetzt solches Interesse erregt, kann mit den geschilderten Methoden verfolgt werden.

Durch Dialyse kann der Preßsaft in einen fermenthaltigen Niederschlag und ein kochbeständiges Koferment getrennt werden, ohne deren Zusammenwirken keine alkoholische Gärung zustande kommt. *Harden* und *Young*[3]) benutzten für diese Trennung eine *Chamberland*sche Filterkerze, in der ein Gelatinefilm niedergeschlagen worden war. Der Apparat, mit Hilfe dessen sie den Saft durch die Kerze preßten, ist im *Harden*schen Buche S. 54/55 abgebildet. *Buchner* und *Antoni*[4]) dialysierten 100 cm^3 Preßsaft während 25 Stunden bei 0° gegen 1300 cm^3 destilliertes Wasser. Dann dampften sie das Dialysat bei 40—50° auf 20 cm^3 ein. Diese enthielten dann das Koferment.

Als Nebenprodukte der alkoholischen Gärung kommen Glyzerin, höhere Alkohole und Bernsteinsäure in Betracht. Die Glyzerinbestimmung kann nach der Methode von *Zeisel-Fanto* (vgl. Bd. II, S. 216) ausgeführt

---

[1]) Vgl. *H. Pringsheim* und *G. Zemplén*, a. a. O.

[2]) Vgl. *Harden*, a. a. O. S. 38.

[3]) *Harden* und *Young*, The alcoholic ferment of yeast-juice. Journ. of Physiology. 32. 1904/05. Proc. Roy. Soc. B. Vol. 77 (1906). S. 405.

[4]) *E. Buchner* und *Antoni*, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46 (1905). S. 136.

werden. So verfahren auch *Buchner* und *Meisenheimer*, Ber. 43 (1910). 1773. Die anderen Nebenprodukte sind beim Eiweißstoffwechsel zu behandeln, da sie aus stickstoffhaltigen Abbauprodukten des Eiweißes hervorgehen.

Darstellung des aktiven Hefensaftes durch Mazeration.[1])

Neuestens hat *v. Lebedew* eine Methode zur Darstellung eines aktiven Saftes aus Hefe angegeben, die es gestattet, die Zymase ohne Anwendung einer hydraulischen Presse und nach den Angaben des Verfassers in viel aktiverer Form als der *Buchner*sche Preßsaft zu gewinnen. Der Saft hat den weiteren Vorteil, daß er glykogenfrei ist und somit keine Selbstgärung zeigt, daß sich seine Ausbeuten vorausberechnen lassen und daß bei fortwährender Anwendung derselben trockenen Hefe auch die Gärkraft des Saftes voraus-bekannt ist. Zu seiner Darstellung wird folgendes Verfahren angegeben:

Das Waschen und Pressen der Hefe. Man gießt einen Eimer frischer Brauereihefe in einen Behälter von mindestens 50 *l* Inhalt, stellt ihn unter den Hahn einer Wasserleitung und läßt das Wasser langsam darüber laufen. Von Zeit zu Zeit rührt man die Hefe mit einem Stabe um. So wäscht man, bis das Wasser klar und fast ungefärbt wird und läßt darauf die Hefe gut absetzen. Wenn man an demselben Tage keine Zeit mehr hat, um sie abzupressen, so darf man sie für eine Nacht im Wasser liegen lassen. Oft wird sie dadurch noch wirksamer, man muß nur im Winter das Wasser aus der Leitung laufen lassen, wenn der Raum geheizt wird. Im Sommer ist es ratsamer, ein großes Stück Eis in den Behälter zu tun.

Wenn nun die Hefe gut abgesetzt ist, dekantiert man das obenstehende Wasser, nimmt eine große Eisen-, Porzellan- oder Tonschale, legt ein 5 *mm*-Sieb darauf, bedeckt es mit einem dünnen Filtriertuch und gießt die Hefe darauf. Nach dem Abtropfen nimmt man die vier Enden des Tuches zusammen, bindet das Ganze mit einer Schnur fest zu, umwickelt es mit einem Preßtuch und preßt mit einer gewöhnlichen Handpresse, bis die Masse so trocken wird, daß man sie durch ein 5 *mm*-Sieb leicht durchsieben kann. Wenn man keine Presse hat, so kann man die umwickelte Hefe auf das Brett legen und mit einem Gewicht beschweren, um sie auf diese Weise abzupressen.

Das Trocknen der Hefe. Die durchgesiebte Hefe breitet man auf einem auf einem Brett liegenden Filtrierpapier in dünner Schicht (1—1½ *cm*) aus und läßt sie dann im Trockenschrank oder Thermostaten bei 25—30° austrocknen, wozu 2 Tage nötig sind. Wenn die Temperatur höher ist, z. B. 35°, so wird dadurch oft die Wirksamkeit der Hefe etwas vermindert, doch nicht immer.

Wenn man sich auch diese Mühe (Waschen, Pressen und Trocknen der Hefe) ersparen will, so kann man die schon trockene Hefe von Schröder, München, Landwehrstraße 45, beziehen.

---

[1]) *A. v. Lebedew*, Darstellung des aktiven Hefensaftes durch Mazeration. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **73** (1911). S. 447.

Darstellung des Hefesaftes. Man nimmt 50 *g* Hefe, fügt 150 *g* Wasser hinzu, rührt die Masse in einer kleinen, zirka 500 cm^3 fassenden Porzellan- oder Glasschale mit einem Glasstab um, bis dieselbe homogen wird und läßt sie dann für 2 Stunden im Thermostaten bei 35° oder 6 Stunden bei 25° stehen. Dann filtriert man die Masse durch ein gewöhnliches Papierfaltenfilter. Das Filtrat ist klar und tritt nach Zusatz des Zuckers gleich oder nach kurzer Zeit in lebhafte Gärung. Im Sommer ist es ratsam, das Filtrat bei dem Filtrieren, besonders wenn man möglichst viel abfiltrieren will, mit Eis zu kühlen. Man bekommt in den ersten 15—20 Minuten 25—30 cm^3, in 12 Stunden aber 70—80 cm^3 Saft.

II. Milchsäuregärung.

Weit komplizierter als die alkoholische Gärung verläuft die Milchsäuregärung der Zucker. Es gibt zwar auch Bakterien, die das Zuckermolekül in zwei Moleküle Milchsäure zerlegen; meist aber entstehen nebenbei Alkohol, Essig- und Bernsteinsäure, Glyzerin und Kohlensäure. Die Bildung und Menge dieser Produkte wird nun nicht nur von den verschiedenen Erregern der Milchsäuregärung, eventuell auch ihren Varietäten, sondern auch durch die Gabe verschiedener Zucker, durch den Grad des Luftzutritts und durch die Stickstoffnahrung verschieden beeinflußt.[1])

Der Konzentrationsgrad der erzielten Milchsäure erreicht meist nicht 1%. Günstig beeinflußt wird die Milchsäurebildung durch die Stickstoffernährung mit Eiweiß und Pepton. Ein geeigneter Nährboden zur Züchtung von Milchsäurebakterien ist wie folgt zusammengesetzt[2]):

100 *g* Molke,
0·5 *g* NaCl,
1 *g* Pepton,
10 *g* Gelatine.

Bezüglich der Bestimmung der Milchsäure und der anderen Produkte kann auf das im Bd. II, S. 1 und folgendes Gesagte verwiesen werden.

Von besonderem Interesse ist, daß nicht nur wie gewöhnlich die rechtsdrehende Komponente der Äthylidenmilchsäure, sondern bisweilen auch razemische, in seltenen Fällen, durch den Bac. acidi laevolactici, auch Linksmilchsäure gebildet wird.

Die sterische Form der gebildeten Milchsäure hängt nicht von der Konfiguration des Substrates, sondern nur von der Natur der Fermente und der von ihnen (und anderen Faktoren) erteilten Reaktionsbeschleunigung ab, die ein bei der Umwandlung sich bildendes, höchstwahrscheinlich inaktives oder razemisches Zwischenprodukt erleidet.[3])

[1]) Vgl. hierzu *H. Weigmann* in *Lafars* Handbuch der technischen Mykologie. Bd. II. Erster und zweiter Abschnitt. G. Fischer. Jena 1905/08 und *W. Kruse*, Allgemeine Mikrobiologie. S. 283.

[2]) *E. Küster*, Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. S. 170.

[3]) *Herzog* und *Hörth*, Zur Stereochemie der Milchsäuregärung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **60** (1909). S. 131.

Bezüglich der Ermittlung der Art der Milchsäure vgl. Bd. II, S. 29.

Die Milchsäurekonzentration kann auch Aufschlüsse über das Alter der Milch und gewisse Milchkrankheiten geben. Für diesen Zweck genügt die Titration von 50 cm^3 Milch mit $\frac{1}{4}$ n-Natronlauge und Phenolphtalein als Indikator.[1] Noch einfacher gelingt die Bestimmung mit Hilfe des *Schaffer*schen Azidimeters für Milch (vgl. Fig. 228). Bis zur Marke *a* wird Phenolphtalein und hierauf bis zum Teilstrich *o* von der zu untersuchenden Milch eingefüllt: nun gießt man 2—2·5 cm^3 $\frac{1}{4}$ n-NaOH hinzu, mischt und fügt weiter Natronlauge hinzu, bis die Rotfärbung bestehen bleibt. Auf dem Teilstrich, bis zu welchem die Mischung im aufrecht gehaltenen Apparat reicht, kann der Säuregrad der Milch direkt abgelesen werden. Um Schaumbildung zu vermeiden, wird nicht geschüttelt, sondern nur 1—2mal umgewendet und so gemischt. Bleibt die Mischung beim Zusatz von 4 cm^3 Lauge rot, so kann die Milch als genügend frisch und rein betrachtet werden.[2]

Fig. 228.



*Schaffer*sches Azidimeter.

III. Buttersäuregärung.[3]

Ähnlich kompliziert wie bei der Milchsäure- liegen die Verhältnisse bei der Buttersäuregärung der Kohlenhydrate. Es ist das eine Gärung, bei der normale Buttersäure als Hauptprodukt, nebenbei aber in einem nach den Versuchs- und Ernährungsbedingungen sehr verschiedenen Maße andere Säuren, wie Ameisen-, Propion-, Essig- und Valeriansäure, dazu Milchsäure und wechselnde Mengen von Alkoholen entstehen. Als Gärgase treten Wasserstoff und Kohlensäure auf. Über die Bestimmung dieser Produkte ist neues nicht hinzuzufügen. (Vgl. Bd. 2, S. 1.)

Es gibt anaerobe und aerobe Buttersäurebakterien, zwischen die sich sicher noch Arten von schwachem Sauerstoffbedürfnis einschieben. Wichtig ist, daß auch die anaeroben Formen durch geringe Sauerstoffspannungen im Wachstum gefördert werden[4], eine Erscheinung, welche auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß den Bakterien die Ausnutzung des Energiematerials in Gegenwart von Sauerstoff besser gelingt.[5] Von diesem Ver-

[1] Vgl. *E. v. Freudenreich*, Die Bakteriologie in der Milchwirtschaft. G. Fischer. Jena 1906. S. 96.

[2] Das Azidimeter für Milch ist bei *Büchi*, Optiker in Bern, erhältlich.

[3] Vgl. *Weigmann* in *Lafars* Handb. d. techn. Mykologie. Bd. 2. S. 109.

[4] *Burri* und *Kürsteiner*, Ein experimenteller Beitrag zur Kenntnis der Bedeutung des Sauerstoffs für die Entwicklung obligat-anaerober Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 21 (1908). S. 289.

[5] *H. Pringsheim*, Über das Sauerstoffbedürfnis anaerober Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 21. (1908). 673.

halten kann man sich dadurch überzeugen, daß die Gasabgabe (H und CO_2) einer gärenden anaeroben Buttersäurekultur bald anhält, wenn man das Glasgefäß unter Wasser ableitet, und daß die Gärung bald wieder einsetzt, wenn man Luft hinzutreten läßt. Sehr auffallend tritt diese Erscheinung auch bei der Methangärung der Zellulose, ebenfalls einer Buttersäuregärung, auf, wie ich mich neuerdings überzeugt habe.

Eine Buttersäuregärung kann man sehr einfach dadurch einleiten, daß man einen Kartoffelkeil, der mit Wasser überschichtet ist, im Reagenzglas 10 Minuten auf 80° erwärmt und bei 37° inkubiert. Man erhält so eine vorgereinigte Kultur des beweglichen Buttersäurebakteriums, welches verschiedene Zucker unter Abgabe von Wasserstoff und Kohlensäure und Bildung von Essigsäure viel Buttersäure und Milchsäure vergärt.[1]) Über die Bindung des Luftstickstoffes durch diese Bakterien vgl. unter Stickstoffassimilation.

IV. Oxal- und Zitronensäuregärung.

Diese beiden Gärungen der Zuckerarten verlaufen so, daß die sie auslösenden Schimmelpilze (für erstere Aspergillaceen, hauptsächlich Asp. niger, für letztere bestimmte Citromycesarten, Citr. Pfefferianus und Citr. glaber) die zuerst gebildeten Säuren später wieder aufzehren. Andere Substanzen als Zucker vermögen die Bildung freier Säure nicht zu bewirken. Durch Zusatz säureabstumpfender Salze, $CaCO_3$, wird die Bildung größerer Säuremengen ermöglicht. Auch die Temperatur hat einen Einfluß auf diese Oxydationsgärungen. Bei 37° bleibt die Anhäufung freier Oxalsäure durch Asp. niger aus, da der Pilz sie bei dieser Temperatur zerstört. Über andere kulturelle Einflüsse vgl.[2])

Methodisch ist hier nichts besonderes bemerkenswert. Die Oxalsäure kann man wie im II. Bd., S. 41 angegeben, bestimmen. *Wehmer*[2]) bestimmte die Zitronensäure, indem er den festen aus $CaCO_3$ und zitronensauren Kalk bestehenden Niederschlag in Salzsäure löste, die Flüssigkeit mit Ammoniak versetzte und aufkochte, wobei nur das Kalziumzitrat ausfällt, das man bei 110° trocknet. So läßt sich die Ausbeute fast quantitativ feststellen.

Auf die Glukonsäure-, Glukuronsäure und Zuckersäuregärung der Kohlenhydrate kann hier nicht eingegangen werden. Literatur bei *Kruse*, S. 386.

V. Mannitgärung.

Die Reduktion von Zucker wird durch den Bac. manniticus bewirkt, der aus Fruktose reichliche Mengen Mannit bildet, bei der Vergärung

[1]) *H. Pringsheim*, Über den Ursprung des Fuselöls und eine Alkohole bildende Bakterienform. Ebenda Bd. **15** (1905). S. 300.

[2]) *C. Wehmer, Lafars* Handb. der techn. Mykologie. Bd. **4**. § 52, Säuregärungen, S. 242.

anderer Kohlenhydrate aber Milchsäure, Essigsäure, Kohlensäure und Alkohol bildet. Der Einfluß der Konfiguration tritt hier deutlich zum Vorschein, denn weder aus d-Glukose, d-Mannose, noch aus d-Sorbose wird durch das Bakterium der entsprechende Alkohol gebildet.[1] Der Bac. wurde aus algerischem mannithaltigen Weinen isoliert.

Nachweis des Mannits. Man läßt 2—3 *cm*³ solcher Weine in einem Uhrglas bei Zimmertemperatur verdunsten. Der Mannit scheidet sich dann in 24 Stunden in seidenglänzenden, feinen, konzentrisch geordneten Nadeln ab. Dieses Verfahren gelingt auch, wenn weniger als 1 *g* Mannit im Liter vorhanden ist.

Bestimmung des Mannits. 50 *cm*³ der zu untersuchenden Flüssigkeit werden im Wasserbade zur dickflüssigen Konsistenz eingeengt, 2—3 Tage zur Kristallisation an einem kühlen Orte hingestellt und der Rest mit 2 *g* feinem, geglühtem Sande gemischt, mit einem Achatpistill unter allmählichem Zusatz von 100 *cm*³ Alkohol bei 85°, der bei derselben Temperatur mit Mannit gesättig war, verrieben. Dann wird filtriert 2 Stunden abtropfen gelassen, das Filter mit seinem Inhalt 1 Stunde lang in 100 *cm*³ Alkohol von 85° im Dampfbade gehalten, nach dem Abkühlen $^4/_5$ des Alkohols abdestilliert, etwas Tierkohle zum Rückstand gesetzt, filtriert, die Tierkohle zweimal mit 50 *cm*³ Alkohol von 85° „ gewaschen und bei 60° verdunstet. Der Rückstand wird als Mannit gewogen. Die Methode gibt sichere Resultate, wenn man vorher den Zucker herausgären läßt.

Eiweißstoffwechsel.

A. Eiweißaufbau.

Bekanntlich fordern verschiedene Mikroorganismen als Stickstoffquellen sehr verschiedene Substanzen. Vom elementaren Stickstoff, dessen Assimilation wir im Gaswechsel berücksichtigen werden, bis herauf zum kompliziert zusammengesetzten Eiweiß, ja den Eiweißsubstraten spezieller Lebewesen, werden die Zwischenstufen als Stickstoffnahrung von verschiedenen Arten niederer Organismen in spezieller Weise gefordert. Ja selbst synthetische stickstoffhaltige Substanzen, die in keiner Beziehung zum Eiweiß stehen, können bisweilen als Nährsubstrate zur Eiweißbildung dienen. Die Anforderungen, die die einzelnen Mikroorganismen an die Stickstoffnahrung stellen, können hier natürlich nicht im einzelnen aufgezählt werden. Zahlreiche Bakterienarten, die Hefen und Schimmelpilze können schon mit Ammoniumsalzen auskommen, bisweilen können diese auch durch Nitrate und bei Vermeidung einer Säurung auch durch Nitrite ersetzt werden. Im allgemeinen herrscht die Regel, daß Aminosäuren

---

[1] *Gayon* und *Dubourg*, Sur les vins mannités. Annales de l'Institut Pasteur. T. VIII (1894), S. 108. Nouvelles recherches sur le ferment mannitique. Ebenda T. XV (1901), S. 527.

bessere Stickstoffquellen sind und daß sie auch anders konstituierte organische Substanzen an Nährwert übertreffen.[1]) Doch gibt es von dieser Regel auch Ausnahmen.[2]) Daß auch synthetische Polypeptide als Stickstoffquelle für Mikroorganismen dienen können, scheint nur natürlich.[3]) Die Frage, ob in all diesen Fällen, wie auch bei der Ernährung mit Pepton und hochmolekularem Eiweiß zuerst eine Abspaltung von Ammoniak erfolgen muß, zu dem auch nach der Anschauung einiger Forscher die Nitrate und Nitrite immer erst reduziert werden, ehe der Eiweißaufbau einsetzt, ist noch unentschieden. Manches spricht dafür und vieles dagegen.[4]) Aspergillus niger baut sein Eiweiß in derselben Weise auf, ob ihm Kaliumnitrat oder Glykokoll oder Glutaminsäure als ausschließliche Stickstoffquelle geboten werden.[5]) Die Hefe[6]) und einige Schimmelpilze[7]) können ihr Gärferment auch in Gegenwart von Zucker nur ausbilden, wenn ihnen Aminosäuren oder andere die Aminosäurerestgruppe enthaltende Stickstoffquellen geboten werden. Auf anderen Stickstoffnährmedien erhält man nicht gärfähige Pilze.

Methodisches.

Bestimmung der Ernte.

Die Eignung einer Stickstoffquelle, wie natürlich auch die irgend einer anderen Nährsubstanz, kann man bei Schimmelpilzen und Hefen, überhaupt bei gut filtrierbaren Mikroorganismen, auf gewogenem Filter nach vorsichtigem Trocknen an der Pilzernte bestimmen. Naturgemäß spielt hierbei aber die Kohlenstoffernährung, ob Zucker oder andere Kohlenstoffquellen, eine große Rolle. Dazu kommt, daß während des Wachstums nicht nur eine Stoffaufnahme, sondern auch eine Dissimilation des Eiweiß erfolgt, über deren Verlauf man sich, wie im folgenden gezeigt werden wird, informieren kann. Die Erntebestimmung ist also nur ein sehr ungenauer Wegweiser für die Stärke der Umsetzung. Auch spielt die Form des Kulturgefäßes eine große Rolle, da hiervon die Befriedigung des Sauer-

[1]) *F. Czapek,* Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Schimmelpilze. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **1**, 538. **2**, 557. **3**, 47. 1902/03.

[2]) *H. Pringsheim,* Der Einfluß der chemischen Konstitution der Stickstoffnahrung auf die Gärfähigkeit und die Wachstumsenergie verschiedener Pilze. II. Biochem. Zeitschr. Bd. 8 (1908). S. 119.

[3]) *E. Abderhalden* und *Y. Teruuchi,* Kulturversuche mit Aspergillus niger auf einigen Aminosäuren und Peptiden. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **47** (1906). S. 394; — *E. Abderhalden* und *H. Pringsheim,* Studien über die Spezifizität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 59 (1909). S. 249.

[4]) Vgl. *H. Pringsheim,* Über Pilzdesamidase. Biochem. Zeitschr. Bd. **12** (1908). S. 18.

[5]) *Abderhalden* und *Rona,* Die Zusammensetzung des „Eiweiß" von Aspergillus niger bei verschiedener Stickstoffquelle. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46** (1905). S. 179.

[6]) *H. Pringsheim,* Über die Stickstoffernährung der Hefe. Biochem. Zeitschr. Bd. **3**. (1907). S. 121.

[7]) *H. Pringsheim,* l. c. Biochem. Zeitschr. Bd. 8 (1908). S. 119.

stoffbedürfnisses abhängt. Man muß also wenigstens für Vergleichsversuche Kulturgefäße derselben Form und derselben Tiefenfüllung benutzen.

Bei Erntebestimmungen darf man höchstens bei 60—80° trocknen; dann muß man zwei Tage im Exsikkator stehen lassen und im Wageglase wägen. Die Filter sind gleichfalls im Exsikkator zu trocknen. Die getrocknete Pilzsubstanz ist stark hygroskopisch. Um Verwechslungen vorzubeugen, bezeichnet man die getrockneten Filter mit Bleistiftnummern.

Ein besseres Kriterium für die Wachstumenergie eines Pilzes bei bestimmter Ernährung ist die Feststellung der Vermehrungsgröße bezüglich der Zahl. Doch kommt diese Methode eigentlich nur für Hefe in Betracht. Die Hefezahl wird ähnlich wie die der Blutkörperchen in einer Zählkammer auf folgende Weise festgestellt.

Der Hefezählapparat.

Der Apparat ist genau so konstruiert, wie der zur Blutkörperchenzählung (Abb. in Bd. II, S. 714, Fig. 243). Die zu untersuchende Kultur wird zuerst kräftig geschüttelt, um die Hefezellen gut zu verteilen. Dann wird eine gemessene Probe entnommen und je nach Bedürfnis, bei kräftigem Wachstum z. B. in Maische, auf das 10fache mit verdünnter Schwefelsäure verdünnt. Nach erneutem kräftigem Schütteln haben sich dann die Hefezellen von einander gelöst. Dann bringt man mit Hilfe einer großen Platinöse so viel Flüssigkeit auf das Tischchen *B*, daß nach Aufschieben des Deckglases keine Luftblasen in dem Raum zwischen diesen beiden vorhanden sind. Nach einiger Zeit haben sich die Hefezellen abgesetzt und man nimmt die Zählung bei 300facher Vergrößerung vor. Man führt die Zählung nicht an einzelnen Quadraten, sondern an Reihen nebeneinanderliegender aus, und zwar wählt man am besten diejenigen, welche von einer Mittellinie durchschnitten sind, und die sich so dem Auge am besten markieren. Liegen Zellen auf den Grenzlinien, so zählt man die auf zwei Seiten mit und läßt die auf den beiden anderen Seiten unberücksichtigt. Man stellt sich mehrere Präparate her und fährt damit so lange fort, bis die mittlere Zahl der in 5 Quadraten liegenden Hefezellen sich nicht mehr erheblich ändert. Jedes Quadrat der Teilung bildet die Grundfläche von 0·0025 mm^2 eines Prisma, dessen Höhe 0·2 *mm* und dessen Rauminhalt demnach 0·0005 mm^3 beträgt. Dieses ist die Volumeneinheit des Hefezählapparates. War z. B. die gefundene Durchschnittszahl für 5 Quadrate 20 Hefezellen bei 10facher Verdünnung, so ist die auf die Volumeneinheit berechnete Zahl $= \frac{20 \cdot 10}{5} = 40$ Hefezellen. Das heißt in 1 cm^3 wären 8 000 000 Hefezellen vorhanden gewesen.[1])

---

[1]) *P. Lindner*, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. P. Parey. 1895. S. 54.

Neuestens hat *Amann*[1]) eine Methode zur direkten Bakterienzählung im Ultramikroskop angegeben, die ganz dem Hefezählungsverfahren entspricht.

Verfolgung des Stickstoffverbrauches und des Stickstoffaustrittes.

Wie schon erwähnt und im Folgenden noch begründet werden wird, findet bei der Gärung der Hefe ein Austritt von Stickstoff aus der Zelle statt. Diese Erscheinung wird wohl eine allgemeine sein, die mit dem Wachstum und der Lebenstätigkeit der Mikroorganismen in stickstoffhaltigen Nährlösungen Hand in Hand gehen muß. Ebenso wie bei höheren Lebewesen ist also auch hier das Leben an einen Stickstoffumsatz gebunden. Diese allgemein interessante Frage verdient eine weitere Bearbeitung.

Aus dem Gesagten geht klar hervor, daß sich aus dem Gehalt der Zellen an Stickstoff nichts über die Stickstoffaufnahme aus der Nährlösung sagen läßt. Auch die Bestimmung der zurückgelassenen Menge an Stickstoffnahrung stößt bei den meisten Stickstoffquellen, wie Eiweiß, Pepton, auch bei Aminosäuren auf unumgängliche Schwierigkeiten, wozu noch kommt, daß gerade diese Bindungsformen des Stickstoffs aus der Zelle ausgeschieden werden. Günstig liegen allein die Verhältnisse beim Ammoniak, und zwar auch nur dann, wenn die in Frage kommende Mikroorganismenform keine Ammoniakanhäufung während ihres Wachstums bewirkt. Davon kann man sich durch Züchtung auf ammoniakfreien Nährböden überzeugen. Außerdem käme noch die Ernährung mit Salpeter in Betracht, der zwar schwerer zu bestimmen ist, aber nie, von nitrifizierenden Organismen abgesehen, ein Dissimilationsprodukt sein wird.

Hefe nun spaltet kein unverbrauchtes Ammoniak ab. Man kann mit ihr zur Ermittlung des Stickstoffumsatzes also wie folgt verfahren. Eine Nährlösung von bestimmtem Ammoniakgehalt wird mit Hefe beimpft. Den Ammoniakverbrauch bestimmt man nach Destillation mit gebrannter Magnesia, wodurch die anderen Stickstoffsubstanzen kein Ammoniak verlieren, durch Titration. Mit Lakmoid als Indikator ist es nötig, die saure Flüssigkeit in der Vorlage aufzukochen, um einen scharfen Umschlag zu erhalten. Den Stickstoffgehalt der Hefe ermittelt man nach *Kjehldahl*. Man findet dann als Differenz des Ammoniakverbrauchs und des Stickstoffgehaltes der Hefe die aus den Zellen ausgetretene Menge Stickstoff, während Wachstum (und Gärung). Folgende Daten geben ein Beispiel für einen derartigen Versuch[2]):

[1]) *H. Amann*, Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittelst des Ultramikroskops. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **29** (1911). S. 381.

[2]) *H. Pringsheim*, Der Einfluß der Stickstoffernährung der Hefe auf den Vermehrungsgrad, die Gärwirkung und den Stickstoffumsatz während der Gärung. Biochem. Zeitschr. Bd. **3** (1907). S. 198.

Stickstoffumsatz der Hefe während der Gärung mit Ammoniak als Stickstoffquelle. 250 cm^3 Lösung mit 15% Zucker.

Vor der Vergärung		Weinhefe					
g $(NH_4)_2SO_4$	g Stickstoff	Reststickstoff als Ammoniakstickstoff bestimmt	Verbrauch des Ammoniakstickstoffs durch die Hefe	Stickstoff der Hefe nach der Gärung	Stickstoffgehalt der Lösung nach der Gärung	Abgabe des Stickstoffs der Hefe an die Lösung während der Gärung	Verhältnis des Stickstoffgehalts zum Stickstoffverbrauch durch die Hefe
abgewogen	bestimmt	bestimmt	berechnet	bestimmt	berechnet	berechnet	
3·026	0·6356	0·5978	0·0378	0·0067	0·6289	0·0311	1 : 5·6

B. Abbau des Eiweiß und der Eiweißspaltungsprodukte.

Der Abbau hochmolekularen Eiweißes durch Mikroorganismen verläuft zuerst dem durch Säurehydrolyse und dem durch die Fermente höherer Lebewesen ganz analog. Auch hier wirken proteolytische Fermente, deren Tätigkeit in besonders deutlicher Weise in der Gelatineverflüssigung vor unser Auge tritt. Meist führt dieser Abbau direkt zu den Aminosäuren; es sind aber in Bakterien auch Fermente gefunden worden, die große Menge von Pepton unangegriffen lassen und die so dem Papayotin näher stehen.[1])

Die proteolytischen Fermente dieser Art können leicht von der Zelle abtrennbar sein oder sie können als Endoenzyme nur zerriebene oder tote Zellen verlassen, wie z. B. die Hefeendotrypstase. Für die Abscheidung derartiger Fermente kommt also die Preßsaftmethode in Betracht. In den meisten Fällen werden die hydrolytischen Spaltungsprodukte von lebenden Mikroorganismen weiter zersetzt, so daß die Aminosäuren nur Zwischenprodukte sind.[2]) Die hierbei nun auftretenden Stoffwechselprodukte können sehr verschiedener Natur sein. Hauptsächlich kommen Amine und Fettsäuren in Frage. Die Zersetzung der Aminosäuren durch Mikroorganismen hat nun in neuerer Zeit eine eingehende Bearbeitung gefunden. Es handelt sich hier vornehmlich um drei Typen, die durch gärende Hefen und Schimmelpilze, durch nicht gärende Schimmelpilze und durch Fäulnisbakterien dargestellt werden. Methodisch wird also zuerst auf den Abbau durch die proteolytischen Fermente und nachher auf die Zerlegung der Spaltungsprodukte einzugehen sein. Zum Schluß ist noch die fermentative Desamidierung dieser zu berücksichtigen.

---

[1]) *Emmerling* und *Reiser*, Zur Kenntnis eiweißspaltender Bakterien. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 35 (1902). S. 700.

[2]) *Abderhalden* und *Emmerling*, Abbau des Gliadin durch Bac. mesentericus vulgatus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 51 (1907). S. 394.

I. Eiweißhydrolyse.

a) Nachweis und Verfolgung der Eiweißspaltung.

Die Fähigkeit der Mikroorganismen, in vielen Fällen eine Eiweißspaltung vollziehen zu können, gibt sich schon durch ihr Gelatineverflüssigungsvermögen kund. Dieses läßt sich am besten in Stichkulturen beobachten. Die Form der Verflüssigungszone ist ja auch als diagnostisches Merkmal der verschiedenen Arten herangezogen worden.[1] Der Ausfall des Versuches hängt jedoch in nicht geringem Grade von der Konzentration des Nährbodens an Gelatine und der Dauer der Einwirkung ab. Mikroorganismen, die bei Zimmertemperatur nicht gedeihen und die so auf Gelatine nicht zum Wachstum gebracht werden können, kann man durch Stichkultur nicht auf ihr Gelatineverflüssigungsvermögen prüfen. Zu diesem Zwecke und für feinere Unterscheidungen bedient man sich hier der Methode von *Eijkmann.*[2] Man stellt sich Milchagarplatten her, indem man Magermilch und Agar (2% in Bouillon) getrennt sterilisiert und erst vor dem Gebrauch, nachdem das Agar geschmolzen und wieder etwas abgekühlt ist, miteinander im Verhältnis von 1:3 bis 1:6 mischt. Man bekommt alsdann ein homogen trübes Medium, während, falls Milch und Agar zusammen sterilisiert werden, das Kasein grobflockig ausfällt. Das Kasein wird meist unter vorheriger Gerinnung peptonisiert, und zwar nach den Angaben des Verfassers von denselben Mikroorganismen, die auch die Gelatine zu verflüssigen vermögen. Ob derartige Verflüssigungen nur durch Ektoenzyme hervorgerufen werden, muß wohl dahingestellt bleiben. Es sind in solchen Kulturen immer absterbende Zellen vorhanden, aus deren Innern auch Endoenzyme austreten werden. Überhaupt dürfte diese Unterscheidung keine zu scharfe sein, denn lebende Mikroorganismen können wohl auch mit Endoenzymen nach außen wirkende Reaktionen auf permeïrende Stoffe ausführen. Weitere und für geringe Fermentmengen geeignete Methoden findet man noch im Bd. III, S. 16. Die quantitative Bestimmung der Proteosenwirkung ist im Bd. III, 2, S. 1256 beschrieben. Andere noch wenig angewandte Methoden gibt *Fuhrmann*[3]) an.

Eine besondere Schwierigkeit beim Nachweis proteolytischer Fermente ergibt sich aus der Tatsache, daß diese keineswegs immer in den Preßsaft, der nach der *Buchner*schen Methode dargestellt wird, übergehen.[4] Dies ist auch häufig eine Hinderung, die Spaltung von Polypeptiden durch die Preßsäfte zu erzielen und sie mit Hilfe der optischen Methoden zu verfolgen[4]), was um so bedauerlicher ist, als man auf diese Weise das beste Mittel in der Hand hat, um die Art der Spaltung razemischer Poly-

[1]) Vgl. z. B. *A. Fischer,* Vorlesungen über Bakterien. G. Fischer. Jena 1903. S. 100 mit Abbildungen.

[2]) *C. Eijkmann,* Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. Zentralbl. f. Bakteriol. I. Abt. Bd. **29** (1901). S. 841.

[3]) *Fuhrmann,* Vorlesungen über Bakterienenzyme. G. Fischer. Jena 1907. S. 22.

[4]) *E. Abderhalden* und *H. Pringsheim,* Beitrag zur Technik des Nachweises interzellulärer Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **65** (1910). S. 180.

peptide, ob symmetrisch oder asymmetrisch gespalten wird, zu verfolgen.[1] Hierzu eignet sich vor allem das d-l-Leuzyl-glyzin, das man in einer Verdünnung von $^{1}/_{6000}$ Mol. mit 0·5 cm³ des Preßsaftes vermischt und in einem durch einen Wassermantel auf konstante Temperatur gehaltenen 1-d-Drehungsrohr bei Toluolgegenwart beobachtet. Findet asymmetrische Spaltung statt, so beobachtet man ein Ansteigen der Drehung, veranlaßt durch das abgespaltene natürliche l-Leuzin, etwa bis zu — 0·16°. Bei Abfall der Spaltung im weiteren Verlaufe der Beobachtung, z. B. nach 210 Minuten, kann man auf symmetrische Spaltung, d. h. nunmehrige Abspaltung des d-Leuzins schließen. Um sich hierüber zu vergewissern, wendet man noch l-Leuzyl-d-leuzin in $^{1}/_{10000}$ Mol.-Verdünnung an. Die positive Drehung dieses Dipeptids von etwa + 0·36° in der angegebenen Verdünnung muß zurückgehen und dem Nullwert zustreben, wenn dieses aus einer natürlichen und einer nichtnatürlichen Komponente des Leucins zusammengesetzte Peptid gespalten wird. Zur Kontrolle sind aber noch Spaltungsversuche mit Glyzyl-alanin und Alanyl-glyzin zu empfehlen, die man nach der Estermethode verarbeitet (vgl. Bd. II, S. 470) und auf die Drehung des eventuell abgespaltenen Alanins untersucht. Bei dieser chemischen Methode kann man an Stelle der Preßsäfte auch die Mikroorganismen unter Toluol mit den Lösungen der Polypeptide zusammenbringen. Schnelle Übersichtsresultate gewinnt man auch mit Hilfe des Seidenpeptons[2], das unter dem Einfluß der hydrolytischen Fermente schwerlösliches Tyrosin abspaltet, welches sich dann auf der Oberfläche der Organismen absetzt (vgl. Bd. III, S. 20). Sichere Angaben über die Herstellung dieses Peptons vergleiche unten.[3]

Wie man mit Hilfe der optischen Methode die Fermentwirkung, z. B. des Hefepreßsaftes gegen Polypeptide, verfolgen kann, ist schon im III. Band, S. 31 angegeben.

b) Die Isolierung der Eiweißspaltungsprodukte durch Mikroorganismen unterscheidet sich nicht von der durch andere Agentien bewirkten, die im Handbuch an verschiedenen Orten eingehend beschrieben wurde. Hervorzuheben wäre noch, daß auch bei der Selbstverdauung, z. B. der Hefe, die normalen Eiweißspaltungsprodukte auftreten.[4]

II. Abbau der Aminosäuren.

a) Durch Hefen und Schimmelpilze.

Bei der Darreichung von Aminosäuren als Stickstoffquelle an Hefen wird immer die in der Natur vorkommende Komponente von ihnen bevorzugt. Auf

[1]) *E. Abderhalden* und *H. Pringsheim*, Studien über die Spezifizität der peptolytischen Fermente bei verschiedenen Pilzen. Ebenda. Bd. 59 (1909). S. 249.

[2]) *E. Abderhalden* und *H. Pringsheim*, Beitrag zur Technik des Nachweises interzellulärer Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 65 (1909). S. 180.

[3]) *E. Abderhalden* und *E. Steinbeck*, Weitere Untersuchungen über die Verwendbarkeit des Seidenpeptons zum Nachweis peptolytischer Fermente. Ebenda. Bd. 68 (1910). S. 312 und dieses Handbuch. Bd. V. Teil 1. S. 578.

[4]) *Schenk*, Über Selbstverdauung einiger Hefearten. Zeitschr. f. Spiritusindustrie. Bd. 28 (1905). S. 397.

welche Weise man somit gärende Hefe zur Spaltung razemischer Aminosäuren verwenden kann, wurde schon in einem anderen Teil des Handbuches beschrieben.[1]) Nach Verbrauch der natürlichen Komponente wird hierbei auch die andere angegriffen. Es handelt sich also nur um eine Bevorzugung, die bei Schimmelpilzen (und auch bei einigen Bakterien) noch weit weniger ausgeprägt ist. Häufig findet hier der Angriff ganz symmetrisch statt, gleichgültig ob die Aminosäuren als gemeinsame Kohlenstoff- und Stickstoffnahrung oder in Gegenwart von Zucker nur als Stickstoffquelle geboten werden.[2]) Für derartige Untersuchungen eignet sich gut das razemische Leuzin und die razemische Glutaminsäure, die wegen ihrer Schwerlöslichkeit in einfacher Weise aus den Kulturflüssigkeiten zu isolieren sind. Sie werden in 0·5—1%iger Lösung, eventuell neben 5%iger Glukose geboten. Während der Abbau der Aminosäuren, wie wir sehen werden, durch gärende Pilze dem durch Hefen zum Teil wenigstens analog zu verlaufen scheint, resultieren beim Wachstum nichtgärender Pilze andere Abbauprodukte.

Vergärung des Leuzins.

Bei der Gärung wird das Leuzin in Isoamylalkohol und das Isoleuzin in d-Amylalkohol übergeführt.[3]) Diese Alkohole machen den Hauptbestandteil des Fuselöls aus, das mit dem gewöhlichen Alkohol überdestilliert und in ihm mit verhältnismäßiger Einfachheit und Genauigkeit bestimmt werden kann (vgl. Bd. II, S. 11). Wir haben also hier ein Mittel an der Hand, um in einer die bisher bekannt gewordenen Untersuchungsmethoden an Tiefe des Einblicks übertreffenden Weise den Stickstoffwechsel einer Mikroorganismenart, und zwar der technisch wichtigsten, der Hefe, zu verfolgen. So konnte gezeigt werden, daß die Umwandlung von Leuzin in Amylalkohol nur in Gegenwart von Zucker und bei gleichzeitiger Vergärung dieses stattfindet[4]), daß aber andrerseits auch gärende abgetötete Hefe wie die Azetondauerhefe diese Spaltung nicht zu vollziehen vermag.[5]) Das Leuzin läßt sich durch andere Stickstoffquellen gegen den Angriff der Hefe schützen[4]), so daß selbst im technischen Betriebe durch Zusatz von Ammonsulfat eine Unterdrückung der Fuselölbildung auf weniger als die Hälfte

[1]) *F. Ehrlich*, Bd. II, S. 563.

[2]) *H. Pringsheim*, Studien über die Spaltung razemischer Aminosäuren durch Pilze. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **65** (1910). S. 96.

[3]) *F. Ehrlich*, Über die Entstehung des Fuselöls. Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzuckerindustrie. Bd. **55** (1905). S. 539.

[4]) *H. Pringsheim*, Über die Stickstoffnahrung der Hefe. Teil III. Biochem. Zeitschrift. Bd. 3 (1908). S. 264/266. — *F. Ehrlich*, Über die Bedingungen der Fuselölbildung und ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 40 (1907). S. 1027.

[5]) *H. Pringsheim*, Über die Bildung von Fuselöl bei Azetondauerhefegärung. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 39 (1906). S. 3713. — *F. Ehrlich*, Zur Frage der Fuselölbildung der Hefe. Ebenda. Jg. 39 (1906). S. 4072.

möglich war.[1]) Weiter wurde der Beweis geführt, daß auch gärende Schimmelpilze bei Zuckergegenwart Leuzin in Amylalkohol umwandeln.[2]) Auch kann man den Einfluß der Konzentration der Stickstoffnahrung, wenn Leuzin allein geboten wird, auf die Intensität der Umwandlung in Amylalkohol genau verfolgen[3]) und die interessante Beobachtung machen, daß bei geringer Stickstoffgabe weit mehr, bis annähernd 200% des gebotenen Leuzins als Fuselöl in der Gärflüssigkeit erscheint, was dadurch zu erklären ist, daß hier die Dissimilationsprodukte des Hefeeiweiß in Gestalt von Aminosäuren von neuem in den Stoffwechsel gerissen und wiederum auf Fuselöl verarbeitet werden.[3])

Methodisch verfährt man dabei so, daß man eine Zuckerlösung mit Hefe beimpft, bis zur völligen Vergärung des Zuckers bei geeigneter Temperatur (22° C) aufstellt und dann im Destillat den Alkohol und das Fuselöl (Bd. II, S. 11) bestimmt. Für das Mengenverhältnis soll folgender Versuch als Beispiel dienen.[4])

15% Zucker, Salze.
Mit *Logos* Hefe beimpft.

g Leuzin in 250 cm^3 Lösung	*g* Stickstoff in 250 cm^3 Lösung	150 cm^3 Destillat		% Fuselöl der vergorenen Flüssigkeit	% Alkohol der vergorenen Flüssigkeit	% Fuselöl des Alkohols
		g Fuselöl in 50 cm^3 des Destillates	% Alkohol des Destillates			
abgewogen	berechnet	bestimmt	bestimmt	berechnet	berechnet	berechnet
3	0·321	I. 0·0788 II. 0·0791	10·50	0·0947	6·30	1·50

Ehrlich hat in ähnlichen Versuchen das Fuselöl nach der *Röse-Herzfeld*schen Methode bestimmt, über die man bei *Lunge*[5]) das Nötige findet.

Vergärung des Tyrosins.

Vor kurzem konnte *Ehrlich*[6]) zeigen, daß auf dieselbe Weise wie aus Leuzin Amylalkohol, aus Tyrosin p-Oxyphenyl-Äthylalkohol durch

[1]) *H. Pringsheim*, Über die Unterdrückung der Fuselölbildung und die Mitwirkung von Bakterien an der Bildung höherer Alkohole bei der Gärung. Biochem. Zeitschr. Bd. **10** (1908). S. 490.

[2]) *H. Pringsheim*, Über die Fuselölbildung durch verschiedene Pilze. Bioch. Zeitschrift. Bd. **8** (1908). S. 128.

[3]) *H. Pringsheim*, Über die Stickstoffnahrung der Hefe. Teil III. Biochem. Zeitschrift. Bd. **3** (1908). S. 264/266. — *F. Ehrlich*, Über die Bedingungen der Fuselölbildung und ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 40 (1907). S. 1027.

[4]) *H. Pringsheim*, Biochem. Zeitschr. Bd. **3** (1907). S. 238.

[5]) *G. Lunge*, Chemisch-technische Untersuchungsmethoden. 5. Aufl. Berlin 1905.

[6]) *F. Ehrlich*, Über die Vergärung des Tyrosins zu p-Oxyphenyl-Äthylalkohol (Tyrosol). Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. 44 (1911). S. 139.

gärende Hefe gebildet wird. Dieser Tyrosol genannte Alkohol bildet einen beständigen Bestandteil der Gärflüssigkeiten, in die er auch ohne Zusatz von Tyrosin durch die Vergärung der Hefeeiweißdissimilationsprodukte gelangt. Zur Darstellung des Tyrosols wird z. B. 15 *g* reines l-Tyrosin (aus Seide) in eine Lösung von 1200 *g* Rohrzucker in 10 *l* Leitungswasser gelöst und mit 600 *g* Brennereipreßhefe bei Zimmertemperatur während 3 bis 4 Tagen bis zum völligen Verschwinden des Zuckers vergoren. Dann wird auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft, mit 5—6 Teilen Alkohol verrieben, filtriert und nach Verjagen des Alkohols mit 100—200 *cm*³ Wasser aufgenommen. Der durch Natriumbikarbonat schwach alkalischen Lösung wird das Tyrosol erschöpfend mit Äther entzogen, aus dem ein alsbald erstarrendes Öl herauskommt. Nach dem Umkristallisieren aus Chloroform wurden 8·5 *g* Tyrosol erhalten. Schmelzpunkt 93°.

Vergärung der Glutaminsäure.

Die Bildung der Bernsteinsäure aus Glutaminsäure, die gleichfalls ein beständiger Bestandteil der Gärflüssigkeiten ist, verläuft nach *Ehrlich*[1]) in völliger Analogie zur Leuzinvergärung. Auch hier ist gärende, lebende Hefe Bedingung usw. Methodisch kann die Bernsteinsäure nach Bd. II, S. 24 bestimmt werden.

Neuestens haben *Neubauer* und *Fromherz*[2]) den Beweis zu führen gesucht, daß die Vergärung der Aminosäuren über die Ketosäuren als Zwischenprodukt erfolgt. Sie zeigten, daß Phenylaminoessigsäure zu Phenylglyoxylsäure und p-Oxyphenyl-brenztraubensäure zu p-Oxylphenyläthylalkohol in Gegenwart von Zucker durch Hefe abgebaut werden. Die α-Aminosäure wird demnach zuerst zur α-Ketosäure abgebaut und diese kann ihrerseits zu demselben Endprodukt wie die α-Aminosäure vergoren werden. Details dieser wichtigen Untersuchung, die Isolierung der Gärprodukte und der dabei entstandenen Nebenprodukte müssen im Original eingesehen werden.

Umwandlung von Aminosäuren in Oxysäuren durch Schimmelpilze.[3])

Während sich die wilden Heferassen und die Kahmhefen wie auch andere den Hefearten schon ferner stehende Organismen, z. B. Dematium pullulans, bei Gegenwart von Zucker Aminosäuren gegenüber wie die Kulturhefen verhalten, vollziehen die Schimmelpilze einen anders gearteten Abbau. Bei Abwesenheit von Zucker, wenn die Aminosäuren als gleich-

[1]) *F. Ehrlich*, Über die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Zeitschr. Bd. **18** (1909). S. 391.

[2]) *Neubauer* und *Fromherz*, Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **70** (1910). S. 326.

[3]) *F. Ehrlich* und *K. A. Jacobsen*, Über die Umwandlung von Aminosäuren in Oxysäuren durch Schimmelpilze. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jg. **44**. S. 888 (1911).

zeitige Kohlen- und Stickstoffquelle geboten werden, findet ein sehr weitgehender Abbau der Aminosäuren statt. Aber auch bei gleichzeitiger Zuckergabe vermögen einige Pilze Aminosäuren zu niedrig molekularen Verbindungen aufzuspalten, während beim Wachstum einer Reihe anderer Schimmelpilze auf Aminosäuren der größte Teil des Moleküls dieser Substanzen erhalten bleibt. Bisher werden Einzelheiten hierüber nur in letzterem Falle, und zwar in bezug auf das in der Natur sehr verbreitete Oidium lactis berichtet.

Für Oidium lactis sind alle natürlich vorkommenden α-Aminosäuren vorzügliche Stickstoffnährmittel, wenn gleichzeitig in genügender Menge die üblichen anorganischen Nährsalze und Glukose, Invertzucker oder Milchzucker als Kohlenstoffquelle geboten werden, die der Pilz für den Eiweißaufbau unbedingt erfordert. In verdünnten Lösungen verbraucht Oidium lactis die Aminosäuren verhältnismäßig schnell und schon nach 4—5wöchentlichem Wachstum ist im Nährsubstrat von diesen Substanzen gewöhnlich nichts mehr nachzuweisen. Bei diesem Vorgang findet regelmäßig eine Desamidierung der als Stickstoffquelle gebotenen Aminosäuren in dem Sinne statt, daß Wasser angelagert und Ammoniak abgespalten wird, entsprechend der Gleichung:

$$R.CH(NH_2)COOH + H_2O = R.CH(OH).COOH + NH_3.$$

Das Ammoniak wird sofort vom Pilz zu seinem Eiweißaufbau verbraucht, während das Gerüst der Aminosäuren fast unverändert erhalten bleibt und in Form der entsprechenden α-Oxysäuren aus der Nährlösung in beinahe quantitativer Ausbeute wiederzugewinnen ist.

Da man beliebige Quantitäten einzelner Aminosäuren mit Oidium lactis in ziemlich kurzer Zeit verarbeiten kann, so ist hiermit eine bequeme Methode zur Darstellung optischer aktiver Oxysäuren gegeben, mit Hilfe deren bisher die Reindarstellung folgender bisher noch nicht beschriebener optisch-aktiver Formen von α-Oxysäuren gelang:

aus l-Tyrosin → d-p. Oxyphenyl-milchsäure

$$HO\langle C_6H_4\rangle.CH_2.CH(NH_2).CO_2H \longrightarrow HO\langle C_6H_4\rangle.CH_2.CH(OH).CO_2H$$

aus d-l. Phenylalanin → d-Phenyl-milchsäure

$$\langle C_6H_5\rangle.CH_2.CH(NH_2)CO_2H \longrightarrow \langle C_6H_5\rangle.CH_2.CH.(OH).CO_2H$$

aus l-Tryptophan → l-Indol-milchsäure

$$C_6H_4\langle^{C.CH_2.CH(NH_2)CO_2H}_{NH}\rangle CH \longrightarrow C_6H_4\langle^{C.CH_2.CH(OH).CO_2H}_{NH}\rangle CH$$

Als Kohlenstoffquelle verwendet man, da der Pilz keine Invertase abscheidet und Rohrzucker somit ungeeignet ist, statt der teueren Glukose

mit Vorteil Invertzuckersirup, den man nach dem Verfahren von *Wohl* und *Kollrepp*[1]) darstellt und den man direkt ohne Neutralisation der Nährlösung zusetzen kann. Zu seiner Darstellung schmilzt man 80 Teile Rohrzucker, 20 Teile Wasser und 0·004 Teile wasserfreie Salzsäure (d. i. 0·005% des Zuckers) auf dem siedenden Wasserbade eine Stunde zusammen, wobei man einen dicken, reinen, völlig farblosen Invertzuckersirup, der keinerlei Nebenprodukte aufweist, erhält.

Wir geben hier die Darstellung von d-p.Oxyphenyl-milchsäure aus l-Tyrosin wieder, von der die der anderen Oxysäuren im Prinzip nicht verschieden sind.

d-p.Oxyphenyl-milchsäure aus l-Tyrosin.

2 *g* Tyrosin werden unter Erwärmen in 2 *l* einer Nährlösung aufgelöst, die enthält 20 *g* Invertzuckersirup, 0·5 *g* K_2HPO_4, 0·5 *g* KH_2PO_4, 0·1 *g* $MgSO_4$ und Spuren Natrium und Eisenchlorid. Die sterilisierte Lösung wird mit Oidium lactis beimpft. Schon nach zwei Tagen zeigt sich an der Oberfläche ein zarter Pilzanflug, der bald stärker wird und in die Flüssigkeit hineinwächst. Nach 6 Tagen hat sich bereits eine starke Pilzdecke gebildet, die, durch Schütteln des Kolbens untergetaucht, bald von einem Pilzmyzel überwuchert wird, das auch die Lösung allmählich erfüllt. Die Flüssigkeit wird dann in der nächsten Zeit noch einige Male geschüttelt. Die Neubildung der Pilzdecke erfolgt schließlich immer langsamer, bis nach 4 Wochen das Wachstum ganz aufzuhören scheint. Nach fünfwöchentlicher Dauer wird der Versuch abgebrochen und die Flüssigkeit abfiltriert.

Die gesammelten Filtrate werden im Vakuum bei 50° bis zum Sirup eingedampft, wobei sich kein Tyrosin abscheidet. Zur Abscheidung gewisser, mit Äther starke Emulsionen bildender Bestandteile wird der Sirup mit dem mehrfachen Volumen Alkohol verrührt, die alkoholische Lösung von den ausgeschiedenen Flocken, die ebenfalls kein Tyrosin enthalten, abfiltriert und der Alkohol daraus verdunstet. Den schließlich erhaltenen Rückstand nimmt man in wenig Wasser auf, versetzt ihn mit wenig Natriumkarbonat bis zur schwach alkalischen Reaktion und extrahiert im kontinuierlichen Extraktor erschöpfend mit Äther.[2]) Auf diese Weise entfernt man geringe Spuren von Tyrosol.

Dann säuert man mit Schwefelsäure stark aus und extrahiert von neuem mit Äther. Der nach dem Trocknen des Äthers mit Natriumsulfat nach Abdampfen hinterbleibende Rückstand von 2·2 *g* wird zur Reinigung mit Wasser aufgenommen und die Lösung einige Zeit mit Tierkohle gekocht. Das Filtrat gibt beim Einengen auf dem Wasserbade einen Kristallbrei, den man nach dem Abkühlen absaugt und noch einmal derselben Behandlung unterwirft. Auf diese Weise wird die Substanz mit verhältnis-

[1]) *v. Lippmann*, Chemie der Zuckerarten. 1904. I. S. 908.

[2]) Sehr gut hat sich bei mir für solche Zwecke der Apparat von *Richard Kempf*, „Über selbsttätige Extraktion wässeriger Flüssigkeiten durch spezifisch leichtere Lösungsmittel. Chemiker-Ztg. **1910**. Nr. 153. S. 1365“ bewährt.

mäßig geringen Verlusten in einer Menge von 1·8 g völlig rein in Form langer, farbloser, seideglänzender Nadeln erhalten, die scharf bei 169° schmelzen. Sie zeigt in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20} = +18{\cdot}14°$ Rechtsdrehung.

Wichtig ist die Methode besonders zur Darstellung optisch-aktiver Oxysäuren, da sie vor der rein chemischen manche Vorteile besitzt.

b) Durch Fäulnisbakterien.

Die Isolierung der Fäulnisbasen ist im II. Bande, S. 1002 dargestellt worden. Hier soll nur noch der Abbau der Aminosäuren bei der Fäulnis beschrieben werden. Daß die Fäulnis des Eiweiß meist durch ein Gemisch von Bakterien eingeleitet wurde, indem man z. B. mit einer faulenden Pankreasflocke impfte, kann nicht als Vorteil betrachtet werden. Man muß mit Reinkulturen zu klareren Resultaten gelangen. So gelingt es z. B. mit Hilfe des Bac. putrificus Bienstock, in Reinkultur einen Fäulnisabbau zu vollziehen. Auch die Verwendung anderer Fäulnisbakterien-Reinkulturen wäre sicherlich ein Fortschritt. Von wesentlichem Einfluß ist es noch, ob man die Aminosäuren als alleinige Stickstoffquelle bietet oder ob man sie ähnlich wie bei der Leuzinvergärung durch eine andere Stickstoffnahrung, z. B. Pepton, teilweise vor dem Angriff schützt. Auf diese Weise wird, wie wir sehen werden, bisweilen die Aminogruppe erhalten und nur eine Kohlensäureabspaltung vollzogen. In allen Fällen handelt es sich hier entweder um eine Kohlensäureabspaltung oder um Eliminierung der Aminogruppe unter Reduktion. Beide Reaktionen können auch kombiniert sein.[1])

Die bei der Eiweißfäulnis auftretenden Fettsäuren[2]) stammen aus Glutaminsäure[3]), die in n-Buttersäure, aus Asparaginsäure[4]), die in Propion- (und Bernsteinsäure) oder aus d-Aminovaleriansäure, die in Isovaleriansäure zerfällt.[5]) Beim Abbau letzterer Säure wurde schon ein Amin, das Isobutylamin, beobachtet. Auch aus Glutaminsäure konnte bei Gegenwart von Pepton noch ein stickstoffhaltiges Abbauprodukt in Gestalt der γ-Aminobuttersäure, wenn auch wohl in geringer Menge, gefaßt werden.[6])

---

[1]) Eine Übersicht über die bisher aus Aminosäuren erhaltenen stickstoffhaltigen Fäulnisprodukte geben *Ackermann* und *Kutscher*, Über die Apporrhegmen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **69** (1910). S. 272.

[2]) *C. Neuberg* und *E. Rosenberg*, Über die bei der Eiweißfäulnis auftretenden Fettsäuren sowie über die optisch-aktive Valeriansäure und Kapronsäure. Biochem Zeitschrift. Bd. **7** (1907). S. 178. Hier eine Zusammenstellung der chemischen Seite der Fäulnis von Aminosäuren.

[3]) *W. Brasch* und *C. Neuberg*, Biochemische Umwandlung der Glutaminsäure in n-Buttersäure. Biochem. Zeitschr. Bd. **13** (1908). S. 299. — *C. Neuberg*, Verhalten von razemischer Glutaminsäure bei der Fäulnis. Ebenda. Bd. **18** (1909). S. 431.

[4]) *C. Neuberg* und *C. Cappezzuoli*, Biochemische Umwandlung von Asparagin und Asparaginsäure in Propionsäure und Bernsteinsäure. Biochem. Zeitschr. Bd. **18** (1909). S. 424.

[5]) *C. Neuberg* und *L. Karczag*, Verhalten von d,l-α-Aminovaleriansäure (d,l-Valin) bei der Fäulnis. Biochem. Zeitschr. Bd. **18** (1909). S. 435.

[6]) *Ackermann*, Über ein neues, auf bakteriellem Wege gewinnbares Aporrhegma. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **69** (1910). S. 273.

Ebenso entstehen aus Lysin Pentamethylendiamin, aus Arginin Tetramethylendiamin und δ-Aminovaleriansäure[1]), aus Histidin β-Imidazoläthylamin und Imidazolylproprionsäure.[2]) Aus Phenylalanin wird Phenyläthylamin, Phenylessig- und Phenylpropionsäure, aus Tyrosin p-Oxyphenyläthylamin, p-Oxyphenylessig- und Propionsäure, und aus Tryptophan Indol, Skatol und Indolessigsäure erhalten. Diese Beispiele mögen genügen. Methodisch sei hier der Abbau der Glutaminsäure[3]) und des Lysins[1]) beschrieben.

Fäulnisabbau der Glutaminsäure.

5 *g* Glutaminsäure werden in 500 *cm*³ Wasser gelöst, mit Soda gerade alkalisch gemacht und nach Versetzen mit einigen Tropfen einer Fäulnislösung (*E. Salkowski*, Praktikum, 3. Aufl. 1906, S. 227) 4 Wochen bei 38° gehalten. Dann werden 250 *cm*³ der Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und unter gleichzeitiger Erhitzung 32 Stunden mit Wasserdampf destilliert. Das Destillat von 2655 *cm*³ forderte zur Neutralisation 81·0 *cm*³ $\frac{n}{5}$ Na OH. Um Verluste durch Dissoziation zu vermeiden, werden noch 19 *cm*³ $\frac{n}{5}$ Na OH zugegeben und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zu 40 *cm*³ eingeengt. Die in einen Rundkolben übergespülte Lösung wird mit 20 *cm*³ Doppeltnormalschwefelsäure angesäuert und zur Zerstörung der Ameisensäure 4 *g* festes Merkurisulfat zugegeben und eine halbe Stunde am Rückflußkühler gelinde gesiedet. Das sich unter deutlicher Kohlensäureentwicklung abscheidende Quecksilberoxydulsalz wird abfiltriert, das in der Flüssigkeit befindliche Quecksilber mit H_2S ausgefällt, der absorbierte Teil des H_2S durch einen kräftigen Luftstrom ausgetrieben, die Schwefelsäure darauf mit warmem Barytwasser und dessen Überschuß mit Kohlensäure entfernt. Die klare Lösung wird nunmehr auf 25 *cm*³ eingeengt, wobei sich etwas Baryumkarbonat abscheidet. Unter Zugabe einiger Tropfen verdünnter Silbernitratlösung, die Spuren von Chloriden niederschlägt, wird aufgekocht und filtriert und dann mit konzentrierter $AgNO_3$-Lösung ausgefällt. Der reichliche, feinkristallinische Niederschlag wird nach zweistündigem Stehen mit kaltem Wasser und absolutem Alkohol gewaschen. Er besteht aus reinem Silberbutyrat. Der von der Analyse bleibende Rest des Silberbutyrates wird in das Kalziumsalz verwandelt und zeigt die Eigenschaften des normalen Butyrates (vgl. Band II, S. 21).

Die bei der Wasserdampfdestillation zurückbleibende schwefelsaure Lösung der nicht flüchtigen Fäulnisprodukte wird auf 75 *cm*³ eingeengt,

[1]) *Ackermann*, Über ein neues, auf bakteriellem Wege gewinnbares Aporreghma. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **69** (1910). S. 273.

[2]) *Ackermann*, Über den bakteriellen Abbau des Histidins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **65** (1910). S. 504.

[3]) *W. Brasch* und *C. Neuberg*, Biochemische Umwandlung der Glutaminsäure in n-Buttersäure. Biochem. Zeitschr. Bd. **13** (1908). S. 299. — *C. Neuberg*, Verhalten von razemischer Glutaminsäure bei der Fäulnis. Ebenda. Bd. **18** (1909). S. 431.

mit Ammonsulfat nahezu gesättigt im kontinuierlichen Ätherextrakte 52 Stunden mit Äther ausgezogen. Nach Abdampfen des Äthers hinterbleibt einmal aus Wasser umgelöst die bei 180—181° schmelzende Bernsteinsäure.

Lysinfäulnis.

98 *g* d-Lysinchlorid, 10 *g* Pepton, 20 *g* Glukose, einige Tropfen Natriumphosphat und Magnesiumsulfat werden in 4 *l* Wasser bei Gegenwart von 20 *g* kohlensaurem Kalk mit einer faulenden Pankreasflocke versetzt 19 Tage bei 36° gehalten. Dann wird bei phosphorsaurer Reaktion eingeengt und die filtrierte Flüssigkeit der Reinigung mit Tannin und Bleioxyd unterzogen und nun bei schwefelsaurer Reaktion eine Fällung mit Phosphorwolframsäure vorgenommen. Die aus dieser mit Barytwasser und Kohlensäure gewinnbaren Karbonate bestanden zum größten Teil aus Pentamethylendiaminkarbonat (vgl. Bd. II, S. 1022).

III. Die fermentative Desamidierung der Aminosäuren.

Von großem Interesse wäre es, die Aminosäuren auf fermentativem Wege zu desamidieren. Man könnte so einen Einblick in die Wege der Spaltung bekommen, welche sie unter dem Einfluß von Mikroorganismen erleiden und man würde wenigstens Fingerzeige für die Beantwortung der Frage erhalten, wie die Aminosäuren im Darmkanal abgebaut werden, ehe sie einer neuen Synthese zum Eiweiß zugeführt werden. Aus den zahlreichen Spaltungsversuchen von Polypeptiden, die *E. Fischer* und *Abderhalden* ausgeführt haben, geht hervor, daß die bisher gewonnenen Fermente höherer Lebewesen keine Abspaltung von Ammoniak aus Aminosäuren vollziehen, denn letztere konnten immer als solche isoliert werden. Auch die Hefe kann in Gestalt der Dauerhefe oder ihres Preßsaftes, wie wir gesehen haben, keinen derartigen Abbau auslösen. Etwas hoffnungsvoller lauten die Berichte über die desamidierende Kraft von Schimmelpilzfermenten (Azetondauerpräparate und Preßsäfte). Sie entfalten auf verschiedene Aminosäuren eine wahrnehmbare, wenn auch recht schwache Wirkung.[1]) Energisch wirkte ein Azetondauerpräparat von Bac. proteus vulgaris auf Asparagin ein.[2]) Hierbei wurden fast 50% des im Asparagin gebotenen Stickstoffs als Ammoniak abgespalten, wobei Asparaginsäure entstand. Der Beweis, daß auch Bernsteinsäure entstand, wurde jedoch nicht erbracht. Man kann also auch hier von keiner wirklichen Desamidierung der Aminosäure sprechen. Es handelt sich nur um die Abspaltung des Amidstickstoffs, welche Verseifung naturgemäß viel leichter verläuft. Das desamidierende Ferment aufzufinden, muß der Zukunft überlassen

[1]) *Shibata*, Über das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5. S. 384 (1904). — *H. Pringsheim*, Über Pilzdesamidase. Biochem. Zeitschr. Bd. 12. S. 16 (1908).

[2]) *Nawiasky*, Über die Umsetzung von Aminosäuren durch Bac. proteus vulgaris. Archiv f. Hyg. Bd. 66 (1908). S. 209.

bleiben. Am größten scheinen die Chancen im keimenden Samen zu sein, in denen bekanntlich eine Eiweißneubildung statthat. Immerhin sei der lehrreiche Versuch von *Nawiasky* hier beschrieben.

Fermentative Ammoniakabspaltung aus Asparagin.

Große Mengen von Bac. proteus werden gewonnen, indem man mit 3- oder 4%igem Pferdemistdekokt-Agar beschickte Petrischalen (Durchmesser 18 *cm*) nach dem Erkalten mit einer Bouillonaufschwemmung des Bazillus bestreicht. Die Schalen bleiben 48—60 Stunden im Brutschrank bei 35°, dann werden die Bakterien mit Hilfe eines Platinspatels vorsichtig vom Agar abgehoben und in sterilen Gefäßen gesammelt. 8 *g* Proteus gaben, nach *Buchner* (vgl. Bd. II, S. 197) in ein Azetondauerpräparat verwandelt, 2·55 *g*. Dasselbe wurde zuerst mit 5% Asparaginlösung angerührt und mit 7 *g* Glaspulver zerrieben und darauf mit 5 *g* Toluol in 100 cm^3 der Asparaginlösung gebracht.

Nach 4½ Tagen konnten folgende Daten ermittelt werden:

Ursprünglich vorhanden N als NH_3 0·0826 *g*.

Nach 4½ Tagen N als NH_3 0·4536 *g* oder 49·28% des mit dem Asparagin zugefügten Stickstoffs. Zu Ammoniakbestimmung verwendet man in solchen Fällen bei leicht zerlegbaren Stickstoffsubstanzen die Bestimmungen ohne Erhitzen (vgl. Bd. III, S. 765).

Zersetzung der Fette, Fettsäuren und Alkohole.

A. Fettzersetzung.

Die noch nicht sehr eingehend untersuchte Zersetzung der Fette durch Mikroorganismen vollzieht sich verhältnismäßig schwierig. Selbst im Boden ist die Fettzersetzung ein im Vergleich zu anderen Abbauvorgängen sehr langsamer Prozeß.[1])

Im allgemeinen scheint der Zersetzung eine lipolytische Spaltung vorauszugehen.[2]) Immer wird nun zuerst das Glyzerin aufgezehrt.[3]) Die Bakterien sollen dann die Fettsäuren ohne Auswahl verzehren, während die Schimmelpilze eine Vorliebe für die niederen Fettsäuren zeigen. Nebenprodukte sollen bei der Fettoxydation nicht entstehen; sie soll einer völligen Verbrennung gleichkommen, was aber wohl anzuzweifeln ist. Die Fettzersetzung soll nur aerob und nie anaerob verlaufen, was für die höheren Fettsäuren eine gewisse Begründung im geringen Sauerstoffgehalt findet.[4])

[1]) *Rubner*, Über Spaltung und Zersetzung von Fetten und Fettsäuren im Boden und in Nährflüssigkeiten. Archiv f. Hyg. Bd. **38** (1900). S. 67.

[2]) Eine Zusammenstellung der bisher bekannt gewordenen fettspaltenden Mikroorganismen gibt *Kruse*. Allgemeine Mikrobiologie. S. 433.

[3]) Vgl. auch *Schreiber*, Über den Fettreichtum der Abwässer und das Verhalten des Fettes im Boden der Rieselfelder Berlins. Archiv f. Hyg. Bd. **45** (1902). S. 295.

[4]) Vgl. das Sammelreferat von *O. Rahn*, Die Zersetzung der Fette. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **15** (1906). S. 53.

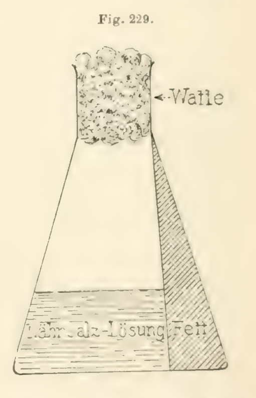
Am eingehendsten ist noch die Zersetzung der Butter durch Mikroorganismen studiert worden, deren Ranzigwerden auf Mikroorganismen zurückzuführen ist.[1])

Methodisches.

Isolierung fettzersetzender Mikroorganismen.

Die Fettzersetzung geht in Anwesenheit organischer Stickstoffquellen schneller als bei mineralischer Stickstoffernährung vonstatten. Das muß naturgemäß der Anhäufung fettzersetzender Mikroorganismen Schwierigkeiten in den Weg stellen, da eine Überwucherung durch andere Arten in Konkurrenz mit den Fettzersetzern möglich ist. Trotzdem ist die Isolierung fettzersetzender Bakterien und Schimmelpilze in Reinkultur gelungen.[2]) Geschmolzenes Fett, Palmfett, Schweinefett etc. wird in einen schräg liegenden Erlenmeyerkolben so gegossen, daß es nur einen kleinen Teil der Glaswand bedeckt (vgl. Fig. 229). Erst nach dem Erstarren des Fettes wird der Kolben aufgerichtet und mit folgender Nährlösung beschickt:

Fig. 229.



Veranschaulichung der Fettzersetzung durch Mikroorganismen nach *Kahn*.

0·5% K_2HPO_4
0·5% $(NH_4)_3PO_4$
0·1% $MgSO_4$
0·1% $CaCl_2$
Spur $FeCl_3$ und $NaCl$.

Die Lösung wird vor dem Gebrauch mit Natronlauge bis zur amphoteren Reaktion gegen Lackmus neutralisiert, wobei sie sich durch Magnesiumammoniumphosphat trübt, das man nicht abfiltriert. Man impft nun mit Erde und beobachtet nach ein paar Wochen eine Entwicklung von Bakterien und Schimmelpilzen (Penicillium glaucum, Pen. luteum?), die in drei Monaten große Löcher in das Fett fressen. Zur Reinkultur schüttelt man eine 1·5%ige Agarmineralsalzlösung im geschmolzenen Zustande kräftig mit Palmfett. Die Emulsion rahmt schnell. Man trennt die fettreiche obere Schicht von der fettarmen unteren, die, durch ganz kleine Fetttröpfchen leicht getrübt, noch genügend Fett zur Ernährung enthält. Diese Nährlösung benutzt man für Plattenkulturen.

---

[1]) Vgl. die Zusammenstellung bei *F. Löhnis*, Handb. d. landwirtschaftl. Bakt. Berlin. Gebr. Bornträger. 1910. S. 298.

[2]) *O. Rahn*, Die Zersetzungen der Fette. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 15. (1906). S. 422.

Nachweis der hydrolytischen Wirkung.[1])

Viel verbreiteter als die oxydierende ist die hydrolysierende Wirkung auf Fette. Sie läßt sich folgendermaßen nachweisen: Man setzt zu Nährgelatine ein Glyzerid, dessen beide Komponenten in Wasser löslich sind, z. B. 5% Butyrin. Die so erhaltenen Platten sind durch kleine Tröpfchen getrübt. An den Stellen, an denen das lipolytische Ferment der Kolonien wirkt, bilden sich um dieselben durchscheinende Kränze. Bakterien, welche keine Lipase enthalten, wachsen auf solchen Platten nicht. Bisweilen ist es vorteilhaft, statt des Butyrins Oleiin anzuwenden; in diesem Falle bilden sich, wenn man der Gelatine Kalisalpeter zusetzt, um die Kolonien weiße Kränze von feinen Kristallen (Elaidinsäure?), sobald die Bakterien imstande sind, Nitrate in Nitrite zu verwandeln. So wirkt z. B. Bac. fluorescens liquef.

Die Nährgelatine hat folgende Zusammensetzung:

Butyrin oder Triolein	0·5%	Anorganische Salze	Spuren
KNO_3	0·1%	Gelatine	15—20%.
K_2HPO_4	0·05%		

B. Zersetzung der Fettsäuren.

In der Natur findet eine Zersetzung der Fettsäuren und anderer Säuren, wie Milchsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure und ähnlicher Säuren statt. Die Untersuchung des Abbaues dieser Säuren durch Mikroorganismen, die zu sehr verschiedenen Produkten, meist Kohlensäure, Methan, Wasserstoff und niedrig molekularen Säuren führen kann, stammt aus einer Zeit, da die Reinkultur noch unbekannt war. Dieses interessante, von *Fitz, Hoppe-Seyler* und anderen angeschnittene Gebiet liegt demnach noch im argen, so sehr auch neuere eingehende Untersuchungen erwünscht wären. Literaturzusammenstellung.[2])

Vergärung der Ameisensäure.

Nach *Omelianski*[3]) werden Ameisensäure zersetzende Bakterien angehäuft, wenn Lösungen von 2% Kalziumformiat und 0·1% Pepton in Leitungswasser in Tiefenkultur mit Pferdemist beimpft werden. Unter dem Einfluß des fakultativ anaeroben Vergärers wird Kalziumkarbonat abgeschieden und das Kalziumformiat nach folgender Gleichung vergoren:

$$Ca(CHO_2)2 + H_2O = CaCO_3 + CO_2 + 2\,H_2.$$

Der so gewonnene Organismus vergärt nur Ameisensäure und keine anderen Fettsäuren, noch Oxalsäure etc.

---

[1]) *E. de Kruyff,* Les bactéries hydrolysant et oxydant les graisses. Bull. du dép. de l'agriculture Indes néerl. 1907. Nr. IX; *Kochs* Jahresbericht. Bd. 18 (1907). S. 510.

[2]) *Kruse,* Allgemeine Mikrobiologie. 436. — *O. Emmerling,* Die Zersetzung stickstofffreier organischer Substanzen durch Bakterien. F. Vieweg und Sohn. Braunschweig 1902. S. 126.

[3]) *W. Omelianski,* Über die Zersetzung der Ameisensäure durch Mikroben. Zentralblatt f. Bakt. II. Abt. Bd. **11**. S. 177 (1903).

Die Fähigkeit, Ameisensäure zu vergären, kommt verschiedenen Bakterienarten zu, z. B. dem Bac. coli und dem Proteus vulgaris; über den Verlauf der Vergärung durch diesen sind eingehende Untersuchungen angestellt worden.[1])

Über die Vergärung der Ameisensäure zu Methan vgl. unter Wasserstoff, S. 977.

Vergärung der Essig- und Buttersäure.

Diese Säuren werden in anderer Weise, und zwar unter Abspaltung von Kohlensäure und Methan, essigsaures Kalzium z. B. nach der Reaktion vergoren:

$$Ca(C_2H_3O_2)_2 + H_2O = 2\,CH_4 + CO_2 + CaCO_3,$$

wenn man Lösungen von 2% essigsaurem Kalzium und 0·2% Pepton in Leitungswasser mit altem Kuhmist beimpft.[2])

* * *

Anschließend sei hier bemerkt, daß Milchsäure zu Buttersäure oder auch Propionsäure, Zitronensäure und Weinsäure zu einfacheren Säuren vergoren werden. Kalziumtartrat wird von gewissen Spirillen nach neuen Angaben glatt zu Kohlensäure und Wasser verbrannt.[3]) All die Mikroorganismen, welche diese und andere Umwandlungen von Säuren vollziehen, sind durch Anhäufung nicht ohne weiteres zu beschaffen. Das Resultat hängt vom Zufall und Geschick des einzelnen ab. Methodisch bildet die Umwandlung nichts besonderes.

C. Zersetzung der Alkohole.

I. Umwandlung mehrwertiger Alkohole.

Mannit, Dulzit, Glyzerin und andere Alkohole sind für sehr zahlreiche Mikroorganismen geeignete Kohlenstoffquellen. Die Produkte ihrer Zersetzung, die vielfach untersucht wurden[4]), sind Säuren und niedere Alkohole (Butylalkohol, Äthylalkohol, Methylalkohol) verschiedener Art, nicht nur in Abhängigkeit von speziellen Mikroorganismenarten, sondern auch von verschiedenen anderen, schwer festzulegenden Versuchsbedingungen. Der Verlauf dieser Zersetzung ist kein einheitlicher.[5]) Auf die Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden. Wichtig ist die Butylalkohol-

---

[1]) *Franzen* und *Braun*, Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. Biochem. Zeitschr. **8** (1909). S. 29. — *Franzen* und *Greve*, Zeitschr. f. phys. Chem. **64**. 169; **67**. 251; **70**. 19 (1910).

[2]) *Omelianski*, Über Methanbildung in der Natur bei biologischen Prozessen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **15** (1906). S. 679.

[3]) *O. Emmerling*, Vergärung von Kalziumtartrat. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **21** (1908). S. 317.

[4]) Literatur bei *Kruse*, Allgemeine Mikrobiologie. S. 418.

[5]) Vgl. z. B. *Frankland*, Transactions of the chem. Soc. 1891; *Kochs* Jahresbericht **2**. S. 234, 237 (1892); **3**. S. 229 (1893).

gärung des Glyzerins, da sie die beste Quelle zur Darstellung des normalen Butylalkohols ist.

Darstellung von n-Butylalkohol aus Glyzerin.[1]

Der Erreger dieser Gärung wurde isoliert, indem eine mit 5% Glyzerin versetzte und mit dem Infus eines elsässischen Heus beimpfte Nährsalzlösung, zur Entfernung des Sauerstoffs, evakuiert und dann bei 40° kultiviert wurde. Man kann auch mit Kuhexkrementen impfen; doch enthalten nicht alle den Butylalkoholbazillus. Nach nochmaliger Anhäufung unter denselben Bedingungen wurde dann anaerob auf Platten kultiviert und so eine Reinkultur des fakultativen anaeroben Buttersäurebakteriums gewonnen. Zur Darstellung des n-Butylalkohols verfährt man so[2], daß man eine 10%ige Glyzerinlösung, die 0·1% Pepton oder Fleischextrakt und einen Überschuß von kohlensaurem Kalk zur Neutralisierung der sich bildenden Säuren enthält, nach der Impfung mit einem Gärverschluß abschließt. Da man wegen der schnellen Entwicklung des Bazillus nicht zu sterilisieren braucht, kann man im großen Maßstabe z. B. in Schwefelsäureballons von 50 *l* Inhalt arbeiten. In einem solchen Kolben ist die erste Gärung etwa nach 4 Wochen beendet, was man daran erkennt, daß keine Gasblasen mehr durch den Gärverschluß entweichen. Man gießt die Flüssigkeit dann vom Schlamm ab, und destilliert so lange ab, bis das Destillat auf der Zunge keinen brennenden Geschmack mehr zurückläßt. Dann bringt man die erkaltete Flüssigkeit wieder auf den Schlamm und stellt von neuem zur Gärung auf. Nach nochmaliger Destillation kann man die Gärung wiederholen. Die vereinigten Destillate werden von neuem destilliert, ihr Destillat mit Pottasche gesättigt, die Alkohole abgehoben und über entwässertem Natriumsulfat getrocknet. Dann wird fraktioniert destilliert und der zwischen 114 bis 118° übergehende Anteil aufgefangen. Die Ausbeute beträgt im Höchstfalle 10% des Glyzerins.

II. Oxydation von Sorbit und Glyzerin durch das Sorbosebakterium.[3]

Das Sorbosebakterium, identisch mit dem Bacterium xylinum Brown, dessen Zooglöa unter dem Namen Essigmutter bekannt ist, wurde aus dem der Selbstvergärung überlassenen Saft der Vogelbeere isoliert. Es oxydiert Alkohole unter Sauerstoffaufnahme zu Zuckern, und zwar nur solche, deren vom Bakterium anzugreifendem Hydroxyl der

$$-\overset{\displaystyle H}{\underset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}-$$

Gruppe ein

[1]) *O. Emmerling,* Butylalkoholische Gärung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **30** (1897). S. 451.

[2]) Privatmitteilung von *O. Emmerling.*

[3]) *G. Bertrand,* Biologische Studie über das Sorbosebakterium. Annal. de chim. et de phys. [8]. T. **3**. p. 181 (1904).

anderes Hydroxyl der nächsten Gruppe und nicht das H-Atom auf derselben Seite der Kette benachbart ist. Aus diesem Grunde hat das Bakterium auch für die Zuckerchemie einen diagnostischen Wert.

Darstellung der Sorbose und des Dioxyazetons.

Man kann von Beerensäften oder reinem Sorbit ausgehen. In letzterem Falle setzt man Hefewasser zu. 250 *cm*³ dieser 2⁰/₀igen Sorbitlösung sind in dünner Schicht beimpft nach 3—4 Wochen bei 30° zur Entfernung der Zooglöa bereit. Nach dem Fällen mit Bleizucker und Entfernen des überschüssigen Bleis mit H_2S wird im Vakuum eingedampft, worauf beim Abkühlen der Zucker auskristallisiert. Aus 100 *g* Sorbit gewinnt man 60 *g* Sorbose. Bei Verwendung von Sorbussäften muß man erst die Erdalkalien mit H_2SO_4 entfernen und mit Alkohol fällen, ehe der Zucker zur Kristallisation kommt. — Auf dieselbe Weise kann man (aus Erytrit Erytrose und) aus Glyzerin Dioxyazeton gewinnen, die man in Gestalt ihrer kristallinischen Bisulfitverbindungen isolieren kann. Wie vorher hervorgehoben, bietet das Dioxyazeton wegen seiner Vergärbarkeit durch Hefe Interesse.

III. Oxydation des Äthylalkohols.

Die Fähigkeit, Alkohol zu oxydieren, kommt zahlreichen Mikroorganismen, z. B. verschiedenen Schimmelpilzen, zu. Sie können hierbei Essigsäure, bisweilen auch Oxalsäure bilden oder eine völlige Verbrennung zu Kohlensäure vollziehen. In ausgesprochener Weise ist hierzu z. B. die Allescheria Gayonii befähigt, die den aus Zucker gebildeten Alkohol weiter verbrennt.[1]) Die Möglichkeit, diese Oxydation zu vollziehen, hängt naturgemäß vom Resistenzgrad gegen den Alkohol ab, der in höheren Konzentrationen für die meisten Mikroorganismen ein Gift ist. Besonders ausgezeichnet sind in dieser Beziehung die Mycodermaarten[2]) und die Essigbakterien[3]), von denen letztere bei 10⁰/₀ Alkohol am günstigsten und bis zu einer Grenze von 14⁰/₀ gedeihen. Interessant ist, daß einige Arten der Essigbakterien auch Methyl-, Propyl-, Butyl-, Isobutyl- und selbst Amylalkohol zu oxydieren imstande sind.[4]) Die bei solchen Vergärungen des Alkohols entstehenden Nebenprodukte bedürfen noch einer eingehenden Bearbeitung. Die chemische Untersuchung bietet nach dem über die Bestimmung der Alkohole und Säuren Gesagten (Bd. II, S. 1) nichts neues.

---

[1]) *Laborde*, Recherches physiologiques sur une moissure nouvelle, l'Eurotiopsis. Gayonii. Annal. de l'Inst. *Pasteur*. T. **11**. p. 1. 1897. — *Mazé*, Recherches sur le mode d'utilisation du carbone ternaire par les vegétaux et les microbes. Ebenda. T. **18**. p. 288 (1904).

[2]) Vgl. *R. Meissner*, Die Mycodermen. *Lafars* Handbuch der technischen Mykologie. Bd. IV. S. 302.

[3]) Literatur bei *O. Emmerling*, Die Zersetzung stickstofffreier organischer Substanz durch Bakterien. S. 12.

[4]) *W. Seifert*, Beiträge zur Physiologie und Morphologie der Essigsäurebakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **3**. S. 337 (1897).

Es gibt sehr verschiedene Arten von Mycodermen und Essigsäurebakterien, die nur durch den geübten Systematiker zu unterscheiden sind.

Man kann diese Pilze wie folgt anhäufen.

Anhäufung von Mycoderma und Essigsäurebakterien.[1]

Im Bier kommen die Essigsäurebakterien immer in Begleitung von Kahmpilzen vor. Läßt man Bier in einem sterilen zur Hälfte damit angefüllten Becherglas bei 25° stehen, so hat sich nach einiger Zeit eine Haut von Mycoderma gebildet, welche die Essigbakterien unterdrückt.

Die Mycoderma kann wenig Säure vertragen und ist empfindlich gegen höhere Temperatur. Die Essigbakterien vertragen viel Säure. Bezüglich der Temperatur zerfallen sie in eine kryophile bei niederer und eine termophile bei höherer Temperatur gedeihende Gruppe. Je niedriger die Temperatur ist, desto mehr Säure ist zur Unterdrückung der Mycoderma erforderlich. Man verfährt deshalb so, daß man 6 sterile, mit flambierten Uhrgläsern bedeckte Bechergläser (200 cm^3) mit den in der folgenden Tabelle angegebenen Konzentrationen von Essigsäure in Bier versetzt und bei den aus der Tabelle zu entnehmenden Temperaturen kultiviert. So erhält man die beiden Gruppen der Essigsäurebakterien.

Temperatur	40	35	30	25	20	15° C
Essigsäure	0	5	10	15	20	25%.

Als künstliche Nährlösung für das die Schnellessiggärung bewirkende Bact. aceti ist folgende zu empfehlen[2]):

100 *g* Leitungswasser,
3 *g* Alkohol,
0·05 *g* Ammonphosphat,
0·01 *g* Chlorkalium.

Die Hauptfundgrube für Essigsäurebakterien sind die Hobelspäne der Essigfabriken.

Das Ferment der Alkoholoxydation

wurde auf ähnliche Weise wie die Azetondauerhefe aus Essigsäurebakterien hergestellt. In Gegenwart von Toluol zeigte es schwache, jedoch analytisch verfolgbare Oxydation zu Essigsäure.[3])

Gasstoffwechsel.

A. Sauerstoff.

Daß alle aeroben Mikroorganismen bei der Atmung Sauerstoff verbrauchen, ist von vornherein klar. Daß auch die Anaeroben, die, wie wir

[1]) *C. Bergsten,* Trennung der Mycoderma von den Essigsäurebakterien im Bier durch Anhäufung. Wochenschr. f. Brauerei. 1906. S. 596.

[2]) *E. Küster,* Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. S. 169.

[3]) *E. Buchner* und *J. Meisenheimer,* Enzyme bei Spaltpilzgärungen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. Jg. **39** (1903). S. 634. — *E. Buchner* und *R. Gaunt,* Über die Essiggärung. *Liebigs* Annalen. Bd. **349**. p. 125 (1906).

gesehen haben, in der Tat in vielen Generationen ganz ohne freien Sauerstoff auskommen können, doch die geringen Spuren dieses Gases, die ihnen nicht schädlich sind, in den Stoffwechsel reißen, um damit Verbrennungen zu vollziehen, haben wir schon bemerkt. Die Mikroorganismenernte, das heißt also der Wachstumsquotient, steht in gewisser direkter Beziehung zum Kalorienwert der verbrauchten Nahrung. Die komplette Verbrennung liefert auch eine bessere kalorische Ausnützung als die Spaltungsgärungen. Die Menge verbrauchten Sauerstoffs, bezogen auf die Einheit der Mikroorganismenmasse, kann außerordentlich groß sein, z. B. verbrauchen 0·5 *g* Leibessubstanz der Essigsäurebakterien 16·5mal so viel Sauerstoff, wobei sie 240mal so viel Alkohol zu Essigsäure verbrennen.

Die Produkte der mikrobiellen Verbrennung können außerordentlich vielfältiger Natur sein. Zahlreiche haben wir schon in Erwägung gezogen. Die Bestimmung der gasförmigen Exkrete ist im Bd. III, S. 516 beschrieben worden.

Fermentative Oxydation.[1]

Durch Azeton, Methylalkohol oder flüssige Luft abgetötete Schimmelpilze (über die Arten wird nichts angegeben) vermögen in Gegenwart von Antisepticis ($^1/_2$% NaFl und etwas Thymol) Säuren, wie Weinsäure, Milchsäure, Traubensäure, Mandelsäure, zu oxydieren. Die Kohlensäureproduktion wurde durch Überleiten der Gase vermittels eines Luftstroms im Kaliapparat gemessen. Die Fermentwirkung dauert nur kurze Zeit an und war nach 36 Stunden nicht mehr wahrnehmbar. Wichtig ist, daß Oxysäuren ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom nicht angegriffen wurden. Bei solchen mit asymmetrischem Kohlenstoffatom wurden die verschiedenen Antipoden verschieden schnell verbrannt. Daraus wird geschlußfolgert, daß die Elektion der Nährstoffe auf einer verschiedenen Reaktionsbeschleunigung beruht, mit der die Substrate von den Agenzien (Azidoxydase genannt) des Organismus angegriffen werden. Die Lösungen enthielten $^1/_2$% der freien Säure.

Beispiel.

Je 11·2 *g* trockene Pilzsubstanz.

Zusatz	Gesamte produzierte CO_2	Verbrauch (durch Titration bestimmt)
L-Weinsäure	0·0511 *g*	0·0082 *g*
R-Weinsäure	0·0869 *g*	0·0620 *g*
Mesoweinsäure	0·0343 *g*	0·0002 *g*
Traubensäure	—	0·0300 *g*
Wasser	0·0348 *g*	—

[1]) *Herzog* und *Meier*, Über Oxydation durch Schimmelpilze. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **57** (1908). S. 34; Bd. **59** (1909). S. 56.

B. Kohlensäure.

Die Kohlensäure ist sehr häufig das Endprodukt der Verbrennung der Kohlenstoffnahrung bei Mikroorganismen, sowohl im aeroben, wie im anaeroben Stoffwechsel. Sie tritt hierbei als Endprodukt des Energie liefernden Stoffumsatzes, häufig auf die Einheit der Mikroorganismenmasse bezogen, in großer Menge auf. Wie man sie auch neben anderen Gasen auf gasanalytischem Wege (Bd. III, S. 555) oder durch Absorption (Bd. III, S. 516) bestimmt, wurde schon angegeben.

Mit einem Chlorophyllapparat ausgerüstete Mikroorganismen, wie Algen und Flagellation, vermögen die Luftkohlensäure in derselben Weise wie höhere Pflanzen zu assimilieren. Spezielle Untersuchungsmethoden dieser Assimilation sind bisher nicht angegeben worden. Es muß auf die bei höheren Pflanzen in diesem Bande (Beitrag von *E. Pringsheim*) verwiesen werden. Auch die *Engelmann*sche Bakterienmethode zum Nachweis und zur Lokalisierung der Assimilation im Spektrum wird dort beschrieben.

Die Assimilation der Kohlensäure durch Purpurbakterien ist von *Molisch* [1]) bestritten worden. Dagegen wird die Kohlensäure von Ammoniak, Eisenoxydulsalz und Schwefelwasserstoff (oder Schwefel) oxydierenden Bakterien mit Ausnutzung der bei diesen Oxydationen frei werdenden Energie assimiliert. Näheres darüber findet man im Abschnitt E_3 und F.

Die Assimilation des Kohlenoxyds durch Bakterien ist noch unbewiesen. [2])

C. Wasserstoff.

Der Beweis, daß Wasserstoff von Bakterien oxydiert wird, ist mehreren Forschern geglückt. Dagegen sind ihre sonstigen Resultate sehr widersprechend. Vor allem sind die bei der Verbrennung von Wasserstoff stattfindenden chemischen Vorgänge noch nicht genügend klargelegt. Man kann aus dem bisher Mitgeteilten nicht herauslesen, ob es sich hier um einen einheitlichen Vorgang handelt oder ob unter verschiedenen Bedingungen verschiedene Prozesse vor sich gehen. Von einer Seite [3]) wird behauptet, daß alle als Methanbilder bekannt gewordenen Mikroben das Vermögen besitzen, den Wasserstoff unter Methanbildung ($CO_2 + 4\,H_2 = CH_4 + 2\,H_2O$) binden zu können. Andrerseits soll es Bakterien geben, die unter Assimilation von Kohlensäure im Dunkeln bei Gegenwart von Sauerstoff Wasserstoff oxydieren. [4]) Hierbei soll die Reduktion der Kohlensäure zu Form-

---

[1]) *Molisch,* Die Purpurbakterien. Jena 1907.

[2]) *B. Niklewski,* Ein Beitrag zur Kenntnis wasserstoffoxydierender Mikroorganismen. II. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **20** (1908). S. 469.

[3]) *N. L. Söhngen,* Anhäufung von Methanmehrern und Methanzehrern. Entstehen und Verschwinden von Wasserstoff und Methan unter dem Einfluß des organischen Lebens. Diss. Delft 1906. Ökologie. S. 256.

[4]) *H. Kaserer,* Über die Oxydation des Wasserstoffs und des Methans durch Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **15** (1906). S. 573.

aldehyd durch den Wasserstoff derart beschleunigt werden, daß der Formaldehyd als Nährstoff dienen kann.[1])

Die Vereinigung von Sauerstoff und Wasserstoff im Knallgasverhältnis unter gleichzeitigem Verbrennen von Kohlensäure wurde von anderer Seite bestätigt[2]), aber auch hier wurde keine Aufklärung über das Verhalten der drei Gase Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlensäure bei derartigen Vorgängen erbracht. Die Frage, ob es sich also um eine langsame Knallgasverbrennung handelt, bei der die frei werdende Energie zur Assimilation der Kohlensäure verwendet wird, oder ob eine Reduktion der Kohlensäure ohne Sauerstoffmitwirkung mit darauffolgender Ausnutzung der Reduktionsprodukte durch die Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle vorliegt, ist noch unklar. Letzteres wird durch die Tatsache wahrscheinlich gemacht, daß die in Reinkulturen erhaltenen Bakterien auch heterotroph zu ernähren waren.[3]) Durch organische Verbindungen wird der freie Wasserstoff mehr oder weniger geschützt; es handelt sich hier also um eine Klasse von niederen Organismen mit höchst kompliziertem Ernährungsmechanismus. Noch ungeklärter ist die behauptete Reduktion der Kohlensäure zu Kohlenoxyd[1]) in einem Bakteriengemisch durch den Wasserstoff und die Assimilation des Kohlenoxyds durch Mikroorganismen.[4])

Anhäufung Wassertoff oxydierender Bakterien.[2])

a) Knallgasverbrennung.

Ich gebe hier die zweite der zur Anhäufung dieser Bakterien beschriebenen Methoden (die erste unter [1])) wieder, die es gestattet, die Gase zu analysieren. Das von *Kaserer*[1]) verwandte Nährsalzgemisch enthielt als Stickstoffquelle Chlorammonium; die Gefahr des Einsetzens der Kohlensäureassimilation unter dem Einflusse der Nitrifikation scheint hier nicht ausgeschlossen. Bei Verwendung von Salpeter als Stickstoffnahrung ist dieser Umstand vermieden, wobei jedoch die Gefahr der Ausnutzung des im Salpeter gebundenen Sauerstoffs und die damit einhergehende Denitrifikation bei Gasanalysen zu berücksichtigen ist. Durch Wiedergabe der Apparate von *Nabokich* und *Lebedeff* will ich jedoch nicht ausdrücken, daß nicht eine bequemere Methodik auffindbar sein mag.

Es werden runde Vakuumkolben von $^1/_2$—$1^1/_2$ *l* Kapazität mit einem rechtwinklig nach unten gebogenen Seitenrohr verwendet. Sie wurden mit 100, respektive 150 *cm*³ folgender Nährlösung beschickt: 1000 *cm*³ Wasser, 0·5 *g* Na_2HPO_4, 2·0 *g* KNO_3, 0·2 *g* $MgSO_4$, 1 *g* $NaHCO_3$ und etwas $FeCl_3$;

---

[1]) *H. Kaserer,* Die Oxydation des Wasserstoffs durch Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **16** (1906). S. 681 u. 769.

[2]) *A. J. Nabokich* und *A. F. Lebedeff,* Über die Oxydation des Wasserstoffs durch Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **17** (1907). S. 350.

[3]) *Niklewski,* Über die Wasserstoffoxydation durch Mikroorganismen. Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik. Bd. **48** (1910). S. 113.

[4]) *B. Niklewski,* Ein Beitrag zur Kenntnis wasserstoffoxydierender Mikroorganismen. II. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **20** (1908). S. 469.

die Lösung zeigt schwache Alkalinität (ca. 0·05 *g* H_2SO_4 auf 100 cm^3). Nach Beimpfen mit Erdpartikeln, respektive Flüssigkeitstropfen von früheren Kulturen wurde der Hals der Kolben zugeschmolzen, das Seitenrohr aber mit einer Ölpumpe in Verbindung gebracht, die es gestattete, im Kolben in wenigen Minuten ein fast vollkommenes Vakuum zu erzielen, welches dann mit kohlensäurehaltigem Knallgas bis zum Atmosphärendruck aufgefüllt wurde. Darauf wurde das Kautschukende des Ansatzrohres mit einem Glasstab verschlossen, und in ein Probierglas unter Quecksilber getaucht. Bei Inkubation (26° C) wurden zuerst am Boden des Gefäßes Bakterienklümpchen wahrgenommen; nach 5—6 Tagen fing die Lösung zu opaleszieren an und nach 8—10 Tagen war auf der Oberfläche eine schleimige Bakterienhaut zu beobachten. Dies war mit Erniedrigung des Gasdruckes im Kolben verbunden, in den stürmisch Wasser eindrang, wenn er unter Wasser geöffnet wurde. Nach 25—30 Tagen war gewöhnlich ein volles Vakuum im Kolben zu beobachten. Bei dem Verfahren hatte sich scheinbar nur eine Bakterienart, dünne Stäbchen von 1·6—2 μ Länge, angehäuft. Um Gas zur Analyse zu entnehmen, wurde der Kolben mit einem völlig evakuierten oder mit Wasser gefüllten Kolben in Verbindung gebracht. Bei der zweiten Überimpfung wurden folgende Analysenresultate erzielt, die zeigen, daß eine Vereinigung von Sauerstoff und Wasserstoff im Knallgasverhältnis stattgefunden hatte. Die Kohlensäure in der Atmosphäre ist wohl überhaupt nicht nötig, da sich die Knallgasatmosphäre doch mit der Bicarbonatlösung ins Gleichgewicht setzt.)

Kulturperiode	Knallgas cm^3	Kohlensäure cm^3	Überflüssiger Sauerstoff cm^3
Vor dem Versuch .	1222	100	28
Nach 13 Tagen . .	543	75	32
Nach 18 Tagen . .	231	67	32
Verbraucht	991	33	—

Reinkultur wasserstoffoxydierender Bakterien[1]) *(Niklewski).*

Als Ursache der ursprünglichen Schwierigkeit der Reinkultur wird von *Niklewski* angegeben, daß die beiden von ihm isolierten wasserstoffoxydierenden Bakterien für sich allein nicht auf mineralischer Nährlösung in Knallgasatmosphäre leben können, sondern nur in Gemeinschaft. Was die Art der hier gemutmaßten Symbiose sein könnte, ist noch unklar. Bei Beimpfung der folgenden Nährlösung aber mit der Bakterienhaut aus der Anhäufungskultur gelangt man mit Leichtigkeit schon in wenigen Tagen zu reinen Kulturen. Man verwendet:

[1]) *Niklewski,* Über die Wasserstoffoxydation durch Mikroorganismen. Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik. Bd. 48 (1910). S. 113.

Agar	1·5%
$NaHCO_3$	0·1%
NH_4Cl	0·1%
KH_2PO_4	0·05%
$MgSO_4$	0·02%
NaCl	0·02%
$FeCl_3$	0·00001%

Die Kulturgefäße, welche steril auf der Oberfläche des festen Nährbodens beimpft wurden, hält man bei 30—35° in einer Atmosphäre, die neben reinem Wasserstoff noch Luft und ein paar Blasen Kohlensäure enthält. Nach 3—4 Tagen gewinnen die Kulturen zwei wasserstoffoxydierende Bakterienarten, über deren kulturelle Unterschiede das Original zu vergleichen wäre.

b) **Methangärung aus Kohlensäure und Wasserstoff.**[1])

Zuerst muß man sich eine Methangärung aus Ameisensäure in Gang setzen. Man füllt Kolben ganz mit folgender Nährflüssigkeit:

Leitungswasser 100, K_2HPO_4 0·05, NH_4Cl 0·05, Kalziumformiat 2·6, impft mit einer beträchtlichen Menge Grabenmoder und kultiviert bei 35°. Es entwickelt sich reichlich Methan; sobald die Gärung nachläßt, wird vom Bodensalz, in dem sich die Bakterien ansiedeln, abgegossen und mit neuer Nährflüssigkeit aufgefüllt, bis die schwarze Farbe des Grabenmoders einer lichtgrauen Platz macht und auch die überstehende Flüssigkeit farblos geworden ist.

Die so vorbereitete Lösung dient nun als Impfmaterial für folgenden Versuch: Es wird ein Gefäß von 302 *cm*³ Inhalt mit 52 *cm*³ Leitungswasser + 0·05% NH_4Cl + 0·05% K_2HPO_4 und 20 *cm*³ der Impfflüssigkeit beschickt und die Luft durch ein Gemisch von 4 Teilen Wasserstoff und 1 Teil Kohlensäure verdrängt. Dann wird im Verlaufe von 9 Tagen noch 1000 *cm*³ Wasserstoff und 250 *cm*³ Kohlensäure hineingepreßt. Schon nach einem Tage sieht man eine kräftige Gärung sich bemerkbar machen, wobei aus dem Bodensatz fortwährend Gasblasen aufsteigen, indem während des Gasabsorptionsprozesses ein anderes Gas gebildet wird. 95% des Gasgemenges hat als Energiequelle, 5% als Nährquelle gedient. Die Methangärung aus Kohlensäure und Wasserstoff ($CO_2 + 4H_2 = CH_4 + 2H_2O$) liefert 62 Kalorien.

Da sich die Vergärung von Kohlensäure und Wasserstoff zu Methan so leicht mit dem Impfmaterial der Formiatgärung einleiten läßt, so wird angenommen, daß es sich hier um denselben Erreger handelt.

D. Methan.

Methan kann Bakterien als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle dienen.[2]) Man kann solche Bakterien auf folgende Weise anhäufen.[3]) Man

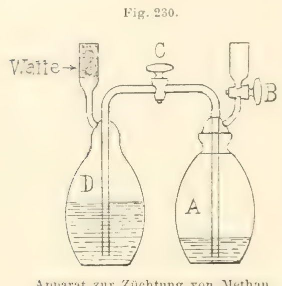
[1]) *Söhngen*, a. a. O.

[2]) *Kaserer*, Zeitschr. f. landw. Vers.-Wes. Österr. 1906. S. 789.

[3]) *N. L. Söhngen*, Über Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 15 (1906). S. 513.

verwendet ein Kulturgefäß, wie es die Abbildung Fig. 230 darstellt. Zuerst wird der Kulturkolben *A* ganz mit der Nährflüssigkeit: dest. Wasser 100. K_2HPO_4 0·05, $Mg(NH_4)PO_4 . 6 H_2O$ 0·1, $CaSO_4$ 0·01, angefüllt und mit Jauche oder Grabenwasser infiziert. Dann wird durch den Hahn *B* ein Gemisch von $^1/_3$ CH_4 und $^2/_3$ Luft zugelassen, sodaß ein Teil der Flüssigkeit nach dem Kolben *D* gepreßt wird. Wenn im Kolben *A* nur noch 1 *cm*³ Flüssigkeitsschicht zurückgeblieben ist, werden beide Hähne geschlossen und zwischen 30—37° kultiviert. Nach 2 bis 4 Tagen nimmt man auf der Flüssigkeit eine Haut wahr, die an Dichte zunimmt und dann deutlich rötlich-braun gefärbt ist. Die Haut besteht der Hauptsache nach aus einer einzigen Bakterienart, die man auf ausgewaschenem Agar mit denselben Nährsalzen und in derselben Gasatmosphäre in Reinkultur gewinnen kann, wenn man von einer durch öfteres Überimpfen gereinigten Bakterienflora ausgeht. Der Bacillus methanicus verbrannte in 14 Tagen mit einer Flüssigkeitsschicht im Kolben *A* von 102 *cm*³, 225 *cm*³ CH_4 in Gegenwart von 320·7 *cm*³ O_2. Es wurden dann 78 *cm*³ CO_2, kein Methan und 172 *cm*³ O_2 gefunden. In der Kulturflüssigkeit waren noch 21 *cm*³ CO_2 gelöst.

Fig. 230.



Apparat zur Züchtung von Methan zersetzenden Bakterien nach *Söhngen*.

E. Stickstoff.

1. Bindung des Luftstickstoffs.

Die Fähigkeit, den Luftstickstoff zu assimilieren, kommt mit Sicherheit hauptsächlich verschiedenen Bakterienarten, einer neu entdeckten Torulaart und in geringerem Grade verschiedenen Pilzen zu. Die stickstoffassimilierenden Bakterien zerfallen in zwei Hauptklassen, die in Gemeinschaft mit Leguminosen lebenden Wurzelknöllchenbakterien und die frei lebenden Stickstoffbinder. Unter diesen können wieder zwei Unterklassen, die anaeroben oder fakultativ anaeroben Clostridium- und die aeroben Azotobakterarten unterschieden werden.[1])

Die Isolierung der Knöllchenbakterien, der Clostridien- und Azotobakterarten und der Torula sei hier beschrieben. Die auf ihr Stickstoffbindungsvermögen geprüften Schimmelpilze werden nicht durch Anhäufung isoliert, sondern in anderweitig gewonnener Reinkultur benutzt. Da ihre Stickstoffbindungskraft noch nicht absolut bewiesen erscheint, seien sie hier übergangen.

---

[1]) Vgl. *H. Pringsheim,* Die Bedeutung stickstoffbindender Bakterien. Biologisches Zentralbl. Bd. **31** (1911). S. 65.

Isolierung von Knöllchenbakterien.

Diese Bakterien wurden zuerst von *Beijerinck*[1]) auf einem Absud von Papilionazeenblättern, Erbsen- oder Fabastengeln + 1/2% Rohrzucker + 7% Gelatine in Reinkultur gewonnen. Die Kultur erfolgte auf Platten. Man kann auch 1% Agar, 1% Maltose, 0·1% K_2HPO_4, 0·02% $MgSO_4$ oder einen Bodenextrakt + 0·5% K_2HPO_4 + 1% Mannit oder Glukose + 1 1/2% Agar verwenden.

1 *kg* Erde wird mit 1 *l* Wasser 1/2 Stunde bei 1 Atm. Überdruck im Autoklaven oder mit 2 *l* Wasser 2 Stunden über freier Flamme erhitzt; die dann etwa 600 *cm*³ betragende Flüssigkeit gibt nach Vermischung mit Talg beim Filtrieren durch festes Papier ein völlig klares Filtrat. Die Erdauszüge sind speziell zur Fortzüchtung kräftig stickstoffbindender Stämme geeignet.[2])

Als Impfmaterial verwendet man Knöllchen von Papilionazeenwurzeln in frischem Zustande, die man zuerst 2—3 Minuten in eine desinfizierende Flüssigkeit (Salzsäure spez. Gew. 1·20 2·5 *cm*³, Sublimat 1 *g*, Wasser 500—1000) einlegt, dann flambiert und mit sterilen Instrumenten öffnet, um aus dem Innern zur Infektion etwas Material zu entnehmen. Dieses vermischt man auf die übliche Weise mit dem verflüssigten Agar oder der Gelatine und gießt Platten, die man bei 20° C kultiviert.[3])

Isolierung von Azotobakter.

Azotobakter wird angehäuft, indem man Leitungswasser mit 2% Mannit und 0·02% K_2HPO_4 in dünner Schicht mit 0·1—0·2 *g* Gartenerde beimpft und bei 27—30° stehen läßt.[4]) Die Reinkultur gelingt leicht auf einem durch 2% Agar starrgemachten Mannitnährboden, auf dem der Pilz kleisterartige Kolonien bildet.

Isolierung von Clostridien.

In Form eines Clostridiums wurde das erste stickstoffbindende Bakterium isoliert.[5]) Es mußte erst von zwei sich bei der Anhäufung gleichzeitig vorfindenden Begleitbakterien getrennt werden. Seine Reinkultur kam nur im Stickstoffstrom zur Bindung des Luftstickstoffs. Trotzdem die Frage, ob

---

[1]) *Beijerinck*, Die Bakterien der Papilionazeenknöllchen. Bot. Ztg. Bd. 46 (1888). S. 763.

[2]) Weitere Nährböden bei *Löhnis*, Handb. d. landwirtschaftl. Bakt. Berlin. Gebr. Bornträger. 1910. S. 726.

[3]) *Harrison* and *Barlow*, The nodule organism of the Leguminosae — its isolation, cultivation, identification and commercial application. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 19 (1907). S. 264.

[4]) *Beijerinck*, Über oligonitrophile Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 7 (1901). S. 561.

[5]) *Winogradsky*, Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. Arch. des Sciences biol. publ. par l'Institut imp. de méd. expér. à St. Petersbourg. T. 3. p. 297 (1895).

diese anaerobe Form stickstoffbindender Clostridien mit der weit einfacher zu isolierenden und zu kultivierenden fakultativ anaeroben Form identisch ist, noch nicht mit völliger Sicherheit entschieden ist[1], sei hier nur die Gewinnung der letzteren Form wiedergegeben, da der Vergleich der Spezialforschung überlassen werden muß.

Man beimpft einen sterilen in Wasser untergetauchten Kartoffelkeil mit Erde und erhitzt im Reagenzglas während 10 Minuten auf 80°. Bei 37° inkubiert, setzt in kurzer Zeit eine energische Buttersäuregärung unter Abgabe von Wasserstoff und Kohlensäure ein und man gelangt zu einer Buttersäurebakterienkultur, die man auf einem 5% Traubenzucker enthaltenden Kartoffelabsud-Agar in einem der früher geschilderten Anaerobenapparate in Reinkultur gewinnen kann. — Die so isolierten Bakterien sind im allgemeinen nicht dazu befähigt, stickstoffreie Nährlösung gleich zu vergären. Man muß ihnen die verloren gegangene Fähigkeit zur Stickstoffbindung wiedergeben. Zu diesem Zwecke beimpft man einen mit der *Winogradsky*schen Nährlösung (2—4% Glukose, K_2HPO_4 0·01%, $MgSO_4$ 0·05%, Spuren von $NaCl + FeSO_4$, 20—40 *g* $CaCO_3$) gefüllten Kolben, die auf 1 *l* einen Zusatz von 0·002 *g* $(NH_4)_2 SO_4$ erhalten hat, mit der Reinkultur. Unter Ausnutzung der geringen Menge gebundenen Stickstoffs, die zur Vergärung der gesamten Zuckermenge nicht ausreichten, tritt Vergärung und Stickstoffbindung aus der Atmosphäre ein. Aus einer so vorbereiteten Kultur kann man durch Überimpfen jetzt direkt stickstofffreie Nährlösung zur Vergärung bringen.[2]

Isolierung der Torula.[3]

Der nicht gärende und keine Sporen bildende Sproßpilz wurde auf den Blättern eines Lorbeerbäumchens gefunden. Wie häufig sein Vorkommen an dieser Fundstelle nachgewiesen werden konnte, wurde bisher nicht angegeben. Die Blätter wurden mit Wasser geschüttelt und die Aufschwemmungsflüssigkeit zur Herstellung von Agarplatten verwandt. Dem Agar war vorher durch oftmaliges Waschen mit Wasser sein Stickstoff möglichst entzogen worden.

Es wurde 2% Agar, 2% Glukose und 0·02% saures phosphorsaures Kali zugegeben und bei 20° kultiviert. Man kann die Torula so bequem in Reinkulturen erhalten, und nach dem Tröpfchenverfahren auch Einzelzellkulturen anlegen.

* * *

Mit Hilfe der so isolierten Kulturen lassen sich nun sehr verschiedenartige Untersuchungen über die Bedingung der Stickstoffassimilation an-

[1] Vgl. *H. Pringsheim*, Über die Identität stickstoffbindender Clostridien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **24** (1909). S. 488.

[2] *H. Pringsheim*, Über ein stickstoffassimilierendes Clostridium. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **16** (1906). S. 795.

[3] *Heinrich Zickes*, Über eine den Luftstickstoff assimilierende Hefe: Torula Wiesneri. Sitzungsber. d. kais. Akad. Wien. Bd. **118**. Abt. I (1909). 1. Juli.

stellen. Man kann, um ein paar Beispiele anzuführen, den Einfluß der Mineralsalze prüfen, wobei sich zeigt, daß Phosphor und Kalk begünstigend wirken. Auch Bodenextrakte vermögen aus noch nicht näher aufgeklärten Gründen die Assimilation zu steigern. Man kann die Menge N bestimmen, die auf die Einheit der verbrauchten Kohlenstoffquelle gebunden wird. Hier findet man, daß auch die Konzentration von Einfluß ist, und daß bei geringen Konzentrationen eine bessere Ausnutzung des Energiematerials erreicht wird.

Wichtig ist es vor allem auch, die als Kohlenstoffquellen möglichen Substanzen zu ermitteln, für die neben Kohlenhydraten und höheren Alkoholen (Mannit) Salze von Fettsäuren in Frage kommen. Bisweilen kann man eine schwer vergärbare Kohlenstoffquelle durch einen Kunstgriff zum Angriff bringen, dadurch, daß man eine geringe Menge einer leicht vergärbaren Substanz, wie Glukose, zusetzt und so die Gärung einleitet.[1]) Wichtig ist vor allem die Ausnutzung der in der Natur so verbreiteten Zellulose. Diese wird als Energiequelle verwendbar, wenn man eine Aufschwemmung davon in stickstoffreier Minerallösung in Gegenwart von kohlensaurem Kalk gleichzeitig mit stickstoffbindenden und zelluloselösenden Bakterien beimpft.[2]) Die Stickstoffbindungskraft des Bodens wird durch Zusatz einer geeigneten Kohlenstoffquelle sehr erhöht. Man verwendet hierzu Zuckerlösungen, mit denen man den Boden nach und nach begießt. Dadurch wird seine Ernteertragsmöglichkeit wesentlich erhöht.[3]) Auch hierzu kann Zellulose Verwendung finden. Man muß jedoch durch Impfung für die Anwesenheit geeigneter Zellulosezersetzer sorgen. Diese isoliert man aus Mist. Sie unterdrücken die Wirkung der im Boden angesiedelten Denitrifizienten.[4])

Impfversuche mit freilebenden Stickstoffsammlern geben meist keine Steigerung der Assimilation, weil diese Organismen an sich überall da verbreitet sind, wo sie passende Ernährungsbedingungen finden. Auf alle Fälle muß man bei derartigen Versuchen darauf achten, daß man mit energisch assimilierendem Material impft. Der Degeneration kann durch eine Umzüchtung auf Erde vorgebeugt werden. Knöllchenbakterien wirken auf Neuland bei gleichzeitigem Leguminosenanbau häufig gut. Man entnehme sie Wurzelknöllchen von Pflanzen derselben Art, die mehrfach im selben Boden gewachsen sind. Die durch Kultur in flüssigen Medien gewonnenen Bakterien streue man nicht im Boden direkt aus, sondern man bringt sie zu-

[1]) Vgl. *H. Pringsheim*, Über die Verwendung verschiedener Energiequellen zur Assimilation des Luftstickstoffs. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **20** (1908). S. 248.

[2]) *H. Pringsheim*, Über die Verwendung von Zellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **23** (1909). S. 300 und Bd. **26** (1910). S. 221.

[3]) *Koch, Litzendorff, Krull* und *Alves*, Die Stickstoffanreicherung des Bodens durch freilebende Bakterien und ihre Bedeutung für das Pflanzenwachstum. Journ. f. Landwirtschaft. Bd. **55** (1907). S. 355.

[4]) *A. Koch*, Über Luftstickstoffbindung im Boden mit Hilfe von Zellulose als Energiequelle. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **27** (1910). S. 1.

sammen mit 1—2%igen Pepton- oder Traubenzuckerlösung auf die Samen. Diese Andeutungen über Versuche mit stickstoffbindenden Bakterien müssen hier genügen.[1])

2. Denitrifikation.

Der Vorgang der Reduktion des Salpeters zu freiem Stickstoff, der von sehr verschiedenen Bakterienarten veranlaßt wird[2]), entspricht einer Verbrennung, die wie folgt formuliert werden kann:

$$2\,KNO_3 + C \ldots = 2\,KNO_2 + CO_2$$

$$\text{und } 4\,KNO_2 + 3\,C \ldots = 2\,N_2 + 2\,K_2CO_3 + CO_2.$$

Daß ein Teil des Salpeters den Bakterien gleichzeitig als Stickstoffquelle dient, ist nebensächlich. Wie man sieht, bildet das Nitrit eine Zwischenstufe des Prozesses. Es gibt dementsprechend Bakterien, die die völlige Reduktion vollziehen, während andere, z. B. Bac. coli, nur die Nitritstufe erreichen, von der aus dann wieder andere die Reduktion zum freien Stickstoff vollenden, z. B. Bac. denitrificans. In diesen Umsatz schiebt sich nach neueren Untersuchungen noch die Bildung und Verbrennung von Stickoxydul ein[3]), auf die wir später zurückkommen.

Die Nitratreduktion verläuft bei schwachem Luftzutritt etwa in vollen Nährgefäßen. Sie wird bedingt durch die Anwesenheit gut ausnutzbarer organischer Stoffe, wofür die Salze von Fettsäuren, von Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure am besten verwendbar sind. Bezüglich der Eignung von Zucker für diesen Zweck ist noch manches im unklaren, wie überhaupt vieles über Denitrifikation noch einer Nachprüfung mit Reinkulturen harrt.

Für die Bearbeitung dieses Gebietes, wie auch der im folgenden zu besprechenden Nitrifikation ist die Bestimmung von Salpetersäure neben salpetriger Säure von großer Bedeutung. Ich gebe deshalb zuerst die hierfür geeignetste Methode an.

Bestimmung von Salpeter- und salpetriger Säure nebeneinander.[4])

Salpetersäure allein: Man verwendet zur Bestimmung der Salpetersäure das Nitron (Diphenyl-endanilo-dihydrotriazol), welches mit der Säure ein sehr schwer lösliches Salz bildet.[5])[6])

[1]) Literatur bei *Löhnis*, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie von S. 634 an.

[2]) *H. Jensen* in *Lafar*, Handbuch der technischen Mykologie. Bd. 3. S. 182 und für die physiologische Deutung: *Czapek*, Biochemie der Pflanzen. Bd. 2. S. 109.

[3]) *Beijerinck* und *Minkmann*, Bildung und Verbrauch von Stickoxydul durch Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 25 (1910). S. 30.

[4]) *M. Busch*, Gravimetrische Bestimmung der Salpetersäure. Ber. d. Deutschen Chem. Gesellsch. Jahrg. 38. (1905). S. 861.

[5]) *M. Busch*, Oxydation der salpetrigen Säure durch Wasserstoffsuperoxyd. Bestimmung von Nitrat neben Nitrit. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. Jahrg. 39 (1906). S. 1401.

[6]) Nitron wird von *E. Merck* in Darmstadt hergestellt. Die gelbe Base soll sich in Essigsäure bei gewöhnlicher Temperatur in der zur Analyse zu verwendenden Konzentration leicht lösen, ungelöste Partikel filtriert man ab. Die Lösung kann man in dunklen Flaschen unzersetzt aufbewahren.

Die zu analysierende Lösung (mit etwa 0·1 *g* HNO_3 in 80—100 *cm*³) wird nach einem Zusatz von 10 Tropfen verdünnter Schwefelsäure nahe zum Sieden erwärmt und mit 10—12 *cm*³ Nitronazetat-Lösung (10°/₀iger Lösung von Nitron in 5°/₀iger Essigsäure) versetzt.

Durch das Fällen aus heißer Lösung schießt das Nitrat in glänzenden Nadeln an und wird so in gut filtrierbarer und waschbarer Form erhalten. Man läßt das Gefäß 1½—2 Stunden in Eiswasser stehen, saugt den Niederschlag in einem Neubauer-Tiegel ab (vgl. Bd. I, S. 97), indem man mit dem Filtrat nachspült und wäscht. Dann wäscht man, nachdem die Flüssigkeit gut abgesaugt ist, mit 10—12 *cm*³ Eiswasser nach. Das Waschwasser wird in kleinen Portionen aufgegossen, wobei man jedesmal wartet, bis die Flüssigkeit durchgesaugt ist. Der Niederschlag wird bei 110° getrocknet, wobei man in ¾ Stunden Gewichtskonstanz erreicht.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel $C_{20} H_{16} N_4 . HNO_3$, das heißt das gefundene Gewicht an Nitronnitrat $G . \frac{63}{375}$ ergibt die Menge der vorhandenen Salpetersäure. Das hohe Molekulargewicht des Nitronnitrats bedingt natürlich einen besonderen Vorteil der Methode, da sich etwa vorkommende Differenzen beim Umrechnen auf Salpetersäure auf ⅙ reduzieren.

Salpetersäure und salpetrige Säure nebeneinander. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß man in einem Teil der zu untersuchenden Flüssigkeit die salpetrige Säure zerstört und die Salpetersäure allein bestimmt und daß man in einem anderen Teil die salpetrige Säure zu Salpetersäure oxydiert und beide gemeinsam als Salpetersäure bestimmt. Aus der Differenz der gefundenen Werte kann man den Gehalt beider Säuren leicht berechnen.

a) Zerstörung der salpetrigen Säure. Die eventuell durch Eindampfen konzentrierte Lösung (z. B. 0·2 *g* der Salze von Salpeter + salpetriger Säure in 5—6 *cm*³ Wasser) läßt man langsam in einem Becherglase auf fein pulverisiertes und mit Wasser angefeuchtetes Hydrazinsulfat tropfen (auf 0·1 *g* $NaNO_2$ z. B. ¼ *g* Hydrazinsulfat), wobei man das Becherglas in Bewegung hält und mit Leitungswasser kühlt. Nach Beendigung der Stickstoffentwicklung wird auf ca. 100 *cm*³ gebracht und wie vorher angegeben mit Nitron gefällt. Resultat: Salpetersäure allein.

b) Oxydation der salpetrigen Säure zu Salpetersäure. 50 *cm*³ der Lösung (von einem Gehalt von 0·1—0·2 *g* Nitrit) werden mit 20 *cm*³ einer 3°/₀igen neutralen Lösung von Wasserstoffsuperoxyd versetzt und nur auf 70° erwärmt. Alsdann läßt man mittelst Tropftrichters 20 *cm*³ reine 2°/₀ige Schwefelsäure am Boden des Gefäßes einlaufen, wobei übrigens nicht einmal besondere Vorsicht erforderlich ist, erhitzt nahezu zum Sieden und fällt mit 12 *cm*³ Nitronazetatlösung. Resultat: Salpetersäure plus zu Salpetersäure oxydierte salpetrige Säure.

Um diese Bestimmungen in Lösungen vorzunehmen, die viel organische Substanz enthalten, z. B. in Bouillonkulturen, muß man dem kolloidalen Ausfallen des Nitronnitrats dadurch vorbeugen, daß man zu je 200 cm^3 Flüssigkeit 2—2½ cm^3 konzentrierte Schwefelsäure zusetzt.[1])

Anhäufung denitrifizierender Bakterien.

Nach dem von *Fuhrmann* (Bd. III, S. 1317) angegebenen Verfahren gelangt man zu Kulturen von Bacterium Stutzeri. Verwendet man an Stelle des Kalziumtartrats 2% Kalziumzitrat, so gewinnt man den Bacillus denitrofluorescens. — Die Anhäufung des Bacillus vulpinus gelingt vermöge seines etwas größeren Sauerstoffbedürfnisses dadurch, daß man die zu verwendende Kulturflasche von 50 cm^3 mit 1—2 *g* Gartenerde beschickt und so weit mit der Nährlösung auffüllt, daß 2 cm^3 Luft darin bleiben. — Von besonderem Interesse sind noch Bakterien, welche die Kohlensäure durch Denitrifikation mit freiem Schwefel als Energiequelle reduzieren. Man füllt eine gut schließende Stöpselflasche ganz mit folgender Nährflüssigkeit:

Grabenwasser	100
Schwefel als Pulver	10
KNO_3	0·05
Na_2CO_3	0·02
$CaCO_3$	2
K_2HPO_4	0·02

und kultiviert bei 30°. Nach 5—6 Tagen beginnt eine regelmäßige Stickstoffentwicklung, worauf in dieselbe Kulturflüssigkeit, in der das Grabenwasser durch destilliertes Wasser plus 0·01 *g* $MgCl_2$ entsetzt ist, übergeimpft wird. Bei dem Vorgang wird der Schwefel in Sulfat umgewandelt. Der hier wirksame Thiobacillus denitrificans kann auf Agar mit derselben Lösung gut in Reinkultur gewonnen werden. Veranlaßt durch die Anwesenheit intermediär gebildeten Schwefelwasserstoffes tritt bei dem Versuch noch eine andere Bakterienart auf, die an und für sich nicht denitrifiziert. Bei Ersatz des Schwefels durch Natriumthiosulfat wird auch sie in Reinkultur gewonnen und dadurch von der erstgenannten Art unterschieden, daß diese große, dünne, glashelle, schwierig sichtbare, mit Schwefeltröpfchen durchsetzte Anflüge erzeugt, während die zweite Form, T. thioparus, kleine, runde, wie trockener, gelber Staub aussehende Kolonien bildet.

Die Anhäufung zellulosezersetzender denitrifizierender Bakterien ist schon unter Zelluloseabbau (S. 934) beschrieben worden. Die Gewinnung denitrifizierender Meeresbakterien kann hier nicht im Detail wiedergegeben werden.[2])

---

[1]) *H. Franzen* und *E. Löhmann,* Über die Verwendung des Nitrons zur Bestimmung der Salpetersäure in Flüssigkeiten, welche viel organische Substanz enthalten. Journ. prakt. Chem. N. F. Bd. **79** (1909). S. 330.

[2]) *H. H. Gran,* Studien über Meeresbakterien. I. Reduktion von Nitraten und Nitriten. Bergens Museum Aarbog. 1901. Nr. 10. Ökologie. S. 205.

Von großer Wichtigkeit für die in der Natur herrschenden Verhältnisse ist die Tatsache, daß dieselben Bakterienformen, die in Flüssigkeitskulturen beträchtliche Mengen freien Stickstoffs aus Nitrat entbinden, im Boden, solange derselbe nicht allzu viel Wasser oder Energiematerial enthält, den Salpeter zwar nach Maßgabe des vorhandenen Vorrats an Energiematerial umsetzen, daraus aber Verbindungen bilden, die bei der Gesamtstickstoffbestimmung wieder gefunden werden.[1]

3. Stickoxydulbildung und Verbrauch.[2]

Die Bildung von Stickoxydul bei der Denitrifikation tritt in Erscheinung, wenn man in hochprozentiger Kaliumnitratlösung arbeitet. Man füllt Stöpselflaschen ganz mit Fleischbouillon, welche mit 8% Kaliumnitrat versetzt ist, infiziert mit 10—20 *g* Gartenerde und kultiviert bei 37°. Das Gasgemisch besteht dann aus Stickstoff, Kohlensäure und Stickoxydul. Letzteres kann bis 90% vorhanden sein, so daß ein glühender Span, in die vorsichtig geöffnete Flasche gebracht, sich entzündet. Zur Analyse fängt man die Gase am besten über gesättigter Chlorkalziumlösung auf. Auch Reinkulturen von denitrifizierenden Bakterien, z. B. von B. pyocyaneus oder B. Stutzeri, bilden Stickoxydul.

Die eben genannten Bakterienarten vermögen das Stickoxydul auch weiter in Reinkultur zu zerlegen. Es entsteht hierbei aus Stickoxydul $2\,N_2O + C = 2\,N_2 + CO_2$ unter Volumenvermehrung $1^1/_2$ Volumen Stickstoff und Kohlensäure. Die Folge davon ist Druckerhöhung bei Kultur im geschlossenen Kolben. Für die Versuche eignet sich eine Nährlösung der Zusammensetzung 100 Leitungswasser, 0·5 Asparagin und 0·05 K_2HPO_4, von der 50 *cm*³ in einen mit Gashahn verschließbaren Stehkolben gebracht werden, in dem die Luft durch Stickoxydul (bereitet aus salzsaurem Hydroxylamin und Kaliumnitrit) verdrängt wird. Nach etwa einer Woche ist das Stickoxydul bei 37° in Stickstoff und Kohlensäure umgewandelt. Auch soll das Stickoxydul z. B. für B. Stutzeri gleichzeitig Stickstoff- und Sauerstoffquelle sein können, wenn die Nährflüssigkeit keine Stickstoffnahrung enthält.

Weiterhin kann Stickoxydul mit Wasserstoff unter dem Einfluß von Bakterien vereinigt werden, die hierbei unter Verbrauch der in der Nährflüssigkeit gebotenen Kohlensäure eine Chemisynthese vollziehen. Hierbei findet Volumenverminderung ($N_2O + H_2 = H_2O + N_2$) bis auf die Hälfte statt. Um diesen Vorgang einzuleiten, bedient man sich des Kulturapparates von *Söhngen* (vgl. S. 978), den man mit 100 Leitungswasser, 0·02 K_2HPO_4, 0·02 NH_4Cl und 0·1 $NaHCO_3$ anfüllt. Man verdrängt dann die Hauptmenge der Nährflüssigkeit durch Einleiten einer Mischung von Stickoxydul und Wasserstoff in gleichem Verhältnis. Nach 10 Tagen ver-

[1] *A. Koch* und *H. Pettit*, Über den verschiedenen Verlauf der Denitrifikation im Boden und in Flüssigkeiten. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 26 (1910). S. 335.

[2] *Beijerinck* und *Minkmann*, Zentralbl. f. Bakteriol. II. Abt. Bd. 25 (1910). S. 30.

schwindet bei Infektion mit Erde alles Stickoxydul und aller Wasserstoff, so daß nur das halbe Volumen Stickstoff zurückbleibt. Die wirksamen Bakterien wurden noch nicht in Reinkultur gewonnen.

4. Nitrifikation.

Die Umwandlung von Ammoniaksalzen in salpetersaure Salze durch Mikroorganismen gehört zu den best untersuchten Vorgängen der Mikrobiologie durch die klassischen Untersuchungen *Winogradskys.*[1]) Sie ragt besonders hervor durch schwierige Lösung des Problems der Reinkultivierung der hier wirksamen Bakterien, die nachzumachen auch jetzt noch keine leichte Aufgabe ist.

Die Oxydation erfolgt in zwei Phasen, Verwandlung von Ammoniak in salpetrige Säure durch die Nitritbildner und Verwandlung von salpetriger Säure in Salpetersäure durch die Nitratbildner. Von beiden Formen sind an verschiedenen Orten der Erde morphologisch differente Arten isoliert worden, die sich jedoch in bezug auf die Kultivierung und die physiologische Funktion analog verhalten. Diese Funktion ist bezüglich der Oxydation der Stickstoffsubstanzen eine durchaus spezifische; weder Ammoniak noch salpetrige Säure kann durch andere Stickstoffsubstanzen, wie Harnstoff, Asparagin etc. ersetzt werden. Im Gegenteil hemmen solche Körper die Nitrifikation in ausgesprochener Weise.

Die bei dem Vorgang frei werdende Energie wird von den Bakterien zur Assimilation der Kohlensäure verwandt, welche auch im Dunklen ohne die Mitwirkung der Sonnenenergie vor sich geht. Auch andere Kohlenstoffquellen hemmen die Nitrifikation in einem sonst nur Giftstoffen zukommenden Maße in Flüssigkeitskulturen. Nur in einer Weise müssen die *Winogradsky*schen Angaben modifiziert werden. Im Boden tritt nämlich die Hemmung durch organische Substanzen zurück.[2]) Hier wird Traubenzucker sogar verbraucht. Welche Rolle er dabei spielt, ist noch nicht ganz klar, denn er vermag die Kohlensäure nicht zu ersetzen.

Anhäufung und Kultur der Nitrit- und Nitratbildner.[3])

Beimpft man eine Nährlösung folgender einfacher Zusammensetzung: Leitungswasser 1000, $(NH_4)_2SO_4$ 1, K_2HPO_4 1, mit Erde unter Zusatz von 5—10 *g* basisch-kohlensaurer Magnesia, so setzt zuerst Nitritation ein, die später durch die Nitratation abgelöst wird. Die wirksamen Organismen häufen sich im Magnesiabodensatz an. Impft man aus solchen im Gang befindlichen Kulturen ab, so wird es vom Zeitpunkte der Überimpfung abhängen, ob man die Nitrit- oder Nitratbildner anhäuft. Um die ersteren

[1]) Zusammenfassung in *Lafars* Handbuch der technischen Mykologie. Bd. III. S. 132.

[2]) *v. Bazarewski,* Beiträge zur Kenntnis der Nitrifikation und Denitrifikation im Boden. Diss. Göttingen 1906. — *Leslie C. Coleman,* Untersuchungen über Nitrifikation. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **20** (1908). S. 401.

[3]) Ich halte mich an die Vorschriften von *Winogradsky,* a. a. O.

zu isolieren, muß man daher eine Prüfung auf chemischem Wege vornehmen. Man prüft auf Ammoniak mit dem *Nessler*schen Reagenz, auf Nitrit mit dem *Trommsdorff*schen (Zinkjodidstärkelösung) und auf Nitrit und Nitrat mit Diphenylamin-Schwefelsäure. Am besten verwendet man für die Tüpfelreaktionen Porzellanplatten mit schalenartigen Vertiefungen. In jede Vertiefung gießt man $1-1^1/_2 cm^3$ des Reagens mit je ein paar Tropfen verdünnter Schwefelsäure. Bringt man dazu je eine Platinöse Kulturflüssigkeit, so breitet sich etwa am 4. Tage im *Trommsdorff*schen Reagens von der Berührungsstelle aus ein blauer Schleier aus. Die Intensität der Reaktion nimmt in den nächsten Tagen zu, bis an der Berührungsstelle ein gesättigter dunkelblauer Fleck entsteht, der sich über die ganze Oberfläche ausbreitet. Man beginnt dann mit dem *Nessler*schen Reagens in derselben Weise, das zu dieser Zeit noch einen deutlich gelben Fleck gibt, der allmählich heller wird und schließlich verschwindet. Ehe dieser Punkt erreicht ist, ist natürlich die Zeit zum Überimpfen für die Nitritbildner gekommen, denn jetzt wird die Diphenylaminreaktion positiv, auch wenn man etwa vorhandenes Nitrit durch Kochen mit Harnstoff in saurer Lösung zerstört hat, denn die Nitritbildner sind in Erscheinung getreten. Diese kann man sich auf einfachere Weise dadurch anhäufen, daß man das Ammonsulfat von vornherein durch ein pro Mill. salpetrigsaures Natrium ersetzt, wobei schon nach zwei Umimpfungen alle ammonoxydierenden Organismen aus der Kultur verschwunden sind. Bezüglich der Morphologie der Bakterien vgl. man die *Winogradsky*sche Abhandlung, die ausgezeichnete Photogramme enthält.

Reinkultur.

Nitritbildner: Die Plattenkultur gelingt weder auf Gelatine noch auf gewöhnlichem Agar, weil der Gehalt an Kohlenstoffsubstanzen hindernd wirkt. Man verwendet Kieselsäuregallerte.

Zur Bereitung der löslichen Kieselsäure mischt man gleiche Raumteile Wasserglas (vom spez. Gew. 1·05—1·06) und Salzsäure (spez. Gew. 1·10), indem man die Wasserglaslösung in die Salzsäure eingießt. Ob Kali- oder Natronwasserglas verwendet wird, ist gleichgültig, nur muß es farblos und klar sein, sonst bekommt man keine haltbare Kieselsäurelösung nach dem Dialysieren. Die Dialyse wird in Pergamentpapierschläuchen vorgenommen, deren Zustand vorher genau auf Durchlochungen zu prüfen ist: man klemmt das eine Ende des Schlauches mit einer Schraubenklemme fest, füllt den Schlauch mit Wasser und hängt ihn in vertikaler Richtung auf. Nur solche Schläuche sind tauglich, die an der Oberfläche keine Spur einer Durchsickerung von Wasser merken lassen. Schnelle Dialyse ist für die Haltbarkeit der Gallerte wichtig, weshalb man nur kleine Mengen auf einmal dialysiert. Gewöhnlich genügt es, einen Tag lang gegen schnell fließendes Leitungswasser und einen Tag gegen 3—4mal gewechseltes destilliertes Wasser zu dialysieren. Die Dialyse ist fertig, wenn man mit Silbernitrat höchstens ganz geringe Trübung erhält. Die Lösung ist in sorgfältig ge-

waschenen Flaschen mit eingeschliffenem Stopfen aufzubewahren. Wenn man richtig verfährt, so erhält man eine vollständig klare Lösung, ohne die geringste Opaleszenz, welche ungefähr 2% Kieselsäure enthält, etwa 3 Monate haltbar ist und ganz gut das Sterilisieren bei 115—120° C verträgt.

Um daraus einen festen Nährboden für den Nitritbildner zu bereiten, bedient man sich folgender Flüssigkeiten:

1. Ammonsulfat 3 *g*.
   Kaliumphosphat 1 *g*.
   Magnesiumsulfat 0·5 *g*.
   Destilliertes Wasser 100 *g*.
2. Ferrosulfat 2%ige Lösung.
3. Gesättigte Kochsalzlösung.
4. Magnesiamilch, d. h. eine Aufschwemmung von gut durchsiebter kohlensaurer Magnesia.

50 cm^3 der Kieselsäurelösung werden in einem Kölbchen mit 2·5 *cm* der ersten und 1 cm^3 der zweiten Lösung versetzt. Von der dritten wird nur ein Tropfen ganz zuletzt in jede fertig gegossene Platte gebracht. Magnesiamilch setzt man so viel hinzu, daß das Gemisch ein milchiges Aussehen bekommt. Gleichzeitig mit den Salzen impft man eine Öse voll einer guten, nach viermaliger Umzüchtung erhaltenen Kultur ein, welche den Nitritbildner vorwiegend im Zustande freier Zellen und nicht von Zooglöen enthält. Das kann man an einer Trübung der Anhäufungskulturen beobachten.

Beim Gebrauch der Platten gibt die Gallerte manchmal allmählich Wasser ab. Darum stellt man die Schalen anfangs umgekehrt im Thermostaten auf und entfernt das sich im Deckel ansammelnde Wasser mit sterilem Filtrierpapier.

Es lohnt sich nicht, die Platten früher nach den Kolonien des Nitritbildners zu durchsuchen, als sie eine starke Nitritreaktion geben. Erst dann, wenn ein aus der Platte herausgeschnittenes kleinstes Stück Gallerte, in Jodstärke oder Diphenylamin eingetragen, ganz dunkelblau wird, hat man die Sicherheit, daß die Platte schon Kolonien, wenn auch mikroskopisch kleine, trägt. Die Nitritreaktion tritt am 5.—6. Tage auf und erreicht am 10.—12. die Höchststärke. Zuerst treten dunkle aus Zooglöen bestehende Kolonien auf, die sich allmählich in weiße der Einzelzellen verwandeln.

Da die Kolonien immer sehr klein bleiben, so muß man noch einen besonderen Kunstgriff gebrauchen, um ein mehr augenfälliges Wachstum zu erreichen und so die Abimpfung zu erleichtern. Das wird durch wiederholte Ammongaben erreicht; an zwei einander diametral gegenüberliegenden Stellen der Schale werden aus der Gallerteschicht kleine Segmente herausgeschnitten und in die so gebildeten Vertiefungen werden, so oft es nötig ist, ein paar Tropfen einer 10%igen Ammonsulfatlösung hineingebracht, wobei man vor jedem Zusatz die angesammelte überschüssige Flüssigkeit aus den Vertiefungen mit einem sterilen Papierstreifen entfernt.

Die Oxydation geht dann sehr energisch vor sich, was man an der raschen Auflösung der Magnesia in der Umgebung der einzelnen Kolonien erkennt.

Man studiert die Platten sorgfältig bei einer Vergrößerung von 50 bis 100, wählt eine Reihe oberflächlich gelegener heller Kolonien aus und bezeichnet sie für die Entnahme des Impfstoffes. Diese geschieht am besten unter der Kontrolle des Präpariermikroskops: man sticht die Kolonien mit der haarfein ausgezogenen Spitze eines Glasröhrchens an, worauf man diese durch einen Stoß gegen den Boden des zur Aussaat bestimmten Kölbchens abbricht. Dazu bedient man sich kleiner Erlenmeyerkölbchen, die 10 *cm*³ der gewöhnlichen Lösung mit Magnesiazusatz enthalten. Je mehr solcher Überimpfungen auf einmal gemacht werden, desto besser, denn es gelingt bei weitem nicht jede, nicht jede erweist sich auch als rein, selbst wenn sie eine gute Nitritration zeigt. Zur Prüfung auf Reinheit impft man einige Tropfen aus dem nitritierten Kölbchen in gewöhnliche alkalische Bouillon und läßt mindestens 10 Tage im Thermostaten stehen. Wenn dann die Bouillonröhrchen noch ganz klar sind, so soll man berechtigt sein, die Reinzucht für gelungen zu halten.

Coleman (l. c.) bezweifelt aber, ob es irgend einen Nährboden gibt, der ganz sicheren Aufschluß über die Reinheit gibt. In seinen Kulturen waren die Nitritbildner von einem Mikrokokkus begleitet, der auf Bouillon nicht oder nur unsicher wächst. Er empfiehlt deshalb zur Prüfung der Reinheit der Nitritkulturen Heydenagar, auf dem durchschnittlich 20mal so viel Kolonien wachsen wie in den üblichen Nährböden. Dieser wird wie folgt bereitet[1]): Zusammensetzung: 1 *l* destilliertes Wasser, 12·5 *g* Agar, 4·5 *g* Albumose (Nährstoff „Heyden" geliefert von der chemischen Fabrik „von Heyden" in Radebeul bei Dresden). Bei der Herstellung wird die Albumose auf das Wasser geschüttet, darin eingequirlt und die Lösung erst dem völlig klar gekochten Agar zugegeben, dann noch einige Minuten gekocht und wie früher angegeben filtriert.

Die Isolierung auf gefaultem Agar, Magnesiagipsplatten oder Papierscheiben ist im Original (*Winogradsky*, S. 158) nachzulesen.

Nitratbildner.

Hier gelingt die Isolierung wegen der geringeren Empfindlichkeit gegen organische Substanzen nach mehrfacher Anhäufung in Nitritlösung auf einem Agar folgender Zusammensetzung:

Natriumnitrit	2 *g*
Soda (wasserfrei)	1 *g*
Kaliumphosphat	Messerspitze
Agar	15 *g*
Flußwasser	1 *l*

Das Wachstum der Kolonien auf Nitritagar ist ungemein langsam. Darum läßt man die Platten etwa 3 Wochen bei 30° stehen. Man

[1]) *Hesse* und *Niedner*, Methodik der bakteriologischen Wasseruntersuchung. Zeitschrift f. Hyg. Bd. **29**. S. 454. 1898.

muß sich sehr in acht nehmen, den spezifischen Erreger nicht mit anderen meist unscheinbaren Bodenbakterien zu verwechseln, welche auf dem Agar etwas ähnliche Kolonien bilden. Doch zeichnet sich der Nitritbildner vor ihnen durch sein langsameres Wachstum aus, so daß man gut tut, die allerkleinste Art von Kolonien für die ersten Abimpfungen zu verwenden. Man verfährt in der Weise, daß man 5—6 Platten mit sehr verschiedenen Impfmengen gleichzeitig anlegt. Das Schwinden der Nitritreaktion ist dann ein Anzeichen, daß die Nitratbildner auf den Platten zur Entwicklung gelangt sind. Man wählt dann bei 100—150facher Vergrößerung die glänzend scharf konturierten und etwas bräunlichen Kolonien aus, von denen man in derselben Weise, wie bei den Nitritbildnern besprochen, abimpft und auf Reinheit prüft.

Will man das Verhältnis des oxydierten Ammoniaks oder Nitrits zur Menge der assimilierten Kohlensäure ermitteln, so bestimmt man den Kohlenstoff am bequemsten auf nassem Wasser. Man vertreibt zuerst die Kohlensäure der Karbonate durch Kochen mit Schwefelsäure und verbrennt dann mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure, wie im Bd. I, S. 359 angegeben.

F. Schwefelwasserstoff.

Die Bildung und Verarbeitung des Schwefelwasserstoffes durch Bakterien spielt in der Natur eine große Rolle. Dieser Stoffumsatz, den wir als Kreislauf des Schwefels zu bezeichnen pflegen und in den sich noch einige Zwischenstufen, wie die Oxydation von Schwefel, von Thiosulfaten und Tetrathionaten einschieben, wird durch sehr verschiedenartige Organismen hervorgerufen. Es handelt sich hier um Prozesse, die im großen ganzen auch im Laboratorium ohne Schwierigkeit einzuleiten sind. Dagegen ist die Trennung der verschiedenen Species, speziell der den Schwefelwasserstoff veratmenden Formen schwierig. Die Reinkultur gerade dieser ist noch nicht gelungen, wodurch naturgemäß der Erforschung ihres Stoffwechsels Hemmnisse in den Weg gestellt werden!

Die Reduktion der Sulfate und die Hydrogenation des Schwefels bedürfen der Energiezufuhr, die durch Zersetzung organischer Substanzen geliefert wird. Andrerseits gestattet die bei der Oxydation des Schwefelwasserstoffs, des Schwefels und des Thiosulfats freiwerdende Energie die Assimilation der Kohlensäure.[1]) Daß dieser Vorgang mit gleichzeitiger Dentrifikation verbunden sein kann, haben wir schon gesehen (vgl. E. 2).

Geruch nach Schwefelwasserstoff macht sich in einer sehr großen Zahl unserer Kulturen bemerkbar. Er stammt aus dem im Eiweiß enthaltenen Schwefel. Da er hieraus wohl ebenso von anaeroben wie von aeroben Organismen gebildet werden kann, ist die Frage noch unentschieden, ob es sich um eine Reduktion oder Spaltung handelt? Wahrscheinlich wird der Prozeß nicht einheitlich verlaufen. Das Studium der Wirkung von Rein-

[1]) Vgl. *W. Omelianski*, Der Kreislauf des Schwefels in *Lafars* Handbuch der technischen Mykologie. Bd. 3. S. 914.

kulturen auf schwefelhaltige Eiweißabbauprodukte kann hier vielleicht einige Aufklärung geben. Wir begnügen uns mit der Angabe einer Methode zum Nachweis schwefelwassersoffbildender Bakterien.

1. Erkennung der Schwefelwasserstoffbildner auf Platten. [1])

Hierfür eignet sich eine Fleischpeptongelatine mit 3% Eisentartrat oder Eisensaccharat. Die Kolonien der Schwefelwasserstoffbildner umgeben sich auf ihr mit einem schwarzen Hof von Schwefeleisen. Auch kann man den schwach alkalischen Nährstoffen Bleikarbonat zusetzen, wodurch gerade das Wachstum der schwefelwasserstoffbildenden Arten wenig gehemmt wird, weil etwa gelöste Spuren von Bleisalz sofort durch den Schwefelwasserstoff in unlösliches Schwefelblei übergeführt werden, welches dann durch seine Braunfärbung die schwefelwasserstoffbildenden Kolonien kenntlich macht. [2])

2. Reduktion der Sulfate zu Schwefelwasserstoff.

Die Reduktion der Sulfate zu Schwefelwasserstoff ist eine Eigenschaft, die nur bestimmten Mikroorganismen zukommt. Sie kann nicht ohne weiteres durch die Wirkung des Wasserstoffes in statu nascendi erklärt werden, denn nicht alle wasserstofferzeugenden Anaerobier haben auch die Fähigkeit der Sulfatreduktion. Andrerseits üben auch starke Schwefelwasserstoffbildner keine reduzierende Wirkung auf andere Substanzen, z. B. Nitrate, aus. Der Mechanismus dieser Reduktion ist also noch unklar. Man kann sulfatreduzierende Bakterien wie folgt anhäufen:

Anhäufung des anaeroben Spirillum desulfuricans. [3]) Als geeignete Kulturflüssigkeit, welche neben Sulfaten stets genügende Mengen organischer Substanzen enthalten muß, erweist sich die Zusammensetzung

Leitungswasser	100
K_2HPO_4	0·05
Natriumlaktat	0·5
Asparagin	0·1
$MgSO_4 + 7H_2O$ (oder) Gips	0·1
Ferrosulfat	Spur.

Das Impfmaterial ist Grabenschlamm. Ist es arm an Reduktionsspirillen, so empfiehlt es sich, nur $^1/_{10}$ bis $^1/_4$% Laktat zu geben und etwas Natriumsulfat zuzusetzen, worauf später in eine Flüssigkeit ohne Sulfat übergeimpft wird. Man kultiviert in vollen Stöpselflaschen bei 25—30°. Von organischen Substanzen erweisen sich Laktate, Succinate und Malate

[1]) *A. Fromme*, Über die Beziehung des metallischen Eisens zu den Bakterien und über den Wert des Eisens zur Wasserreinigung. Zentralbl. f. Bakt. Bd. **12** (1892). S. 274.

[2]) *Beijerinck*, Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgraben und Aufstellung der Gattung Aerobakter. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **6**. S. 193 (1900).

[3]) *Beijerinck*, Anhäufung des anaeroben Spirillum desulfuricans. Trennung von Aerobien. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **1** (1895). S. 1, 49, 104. — *van Delden*, Beitrag zur Kenntnis der Sulfatreduktion durch Bakterien. Ebenda. II. Abt. Bd. **11**. S. 81 (1903).

geeignet, nicht Zucker, aus dem Säure gebildet wird. Von Stickstoffverbindungen werden auch Pepton und Ammonsalze assimiliert. Dagegen hindern Nitrate die Sulfatreduktion. Die Konzentration des Schwefelwasserstoffes kann eine ziemlich hohe werden, ohne daß die Sulfatspirillen abgetötet werden, z. B. bis zu 246 *mg* H_2S pro Liter.

Bei der Kultur auf Gelatine mit derselben Nährlösung erscheinen die Spirillen als kleine schwarze Pünktchen, umgeben von einem Hof von Schwefeleisen. Doch sind solche Kulturen stets durch eine andere Sulfat nicht reduzierende Form verunreinigt. Diese läßt sich durch einen Zusatz von $^1/_2$ *cm*³ Schwefelwasserstoffwasser zu 30 *cm*³ der Nährgelatine ausschalten. Die Spirillenkolonien entwickeln sich dann in Tiefen von $1^1/_2$ und mehr Zentimeter unter der Oberfläche. Nach wiederholten Umimpfungen kann man sie so von dem Begleitbakterium, Aerobacter coli, rein erhalten. Eine Seewasserform, Microspira aestuarii, läßt sich bei einem Zusatz von 3% Kochsalz, 0·25% $MgSO_4$ und 1% Natriumlaktat gewinnen. Auch dieses Spirillum ist beweglich. Es bildet noch mehr Schwefelwasserstoff, bis 952 *mg* H_2S pro Liter.

3. Reduktion von Sulfiten, Thiosulfaten und Schwefel.

Während die Sulfatreduktion auf die besprochenen Arten beschränkt zu sein scheint, wird die Reduktion der oben genannten Substanzen viel leichter und von zahlreichen Mikroorganismenarten, z. B. auch Hefe, besorgt. Die Koligruppe zeigt diese Reduktion in Lösungen, die 5% Traubenzucker, 0·1% Asparagin, 0·01% K_2HPO_4 und 0·05% Natriumthiosulfat enthalten, schon nach 24 Stunden.[1])

Die Hydrogenisation des Schwefels ist ein sekundärer Prozeß, der sich infolge vieler Reduktionen abspielt. Man kann sie folgendermaßen einleiten.[2]) Man macht in einem Kölbchen Fleischwasser durch Kochen luftfrei und fügt 0·1% Ferrolaktat oder *Mohr*sches Salz als Indikator zu. Ein zweites Kölbchen enthält überdies Schwefelblume. Beimpft man mit einem Tropfen Grabenwasser oder etwas Gartenerde, so findet keine Sulfatreduktion statt. Doch tritt bei beiden Proben bei 30° schon in 24 Stunden infolge von Schwefeleisenbildung Schwärzung auf. In dem Kölbchen ohne Schwefel erreicht die Schwärzung bald eine gewisse Grenze, während sie in dem mit Schwefel versetzten Kölbchen viel länger fortschreitet und unter Ausscheidung einer großen Menge eines schwarzen Niederschlages die Flüssigkeit tiefschwarz werden läßt.

4. Oxydation von Schwefelwasserstoff.

Die Festlegung der Lebensbedingung der „Schwefelbakterien“ durch *Winogradsky* war von ganz besonderer Bedeutung, weil hier zum ersten

[1]) *Beijerinck,* Phénomènes de réduction produits per les microbes. Archives néerlandaises. II. T. **9**. p. 131 (1904).

[2]) *Beijerinck,* Über Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfatreduktion. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **1**. S. 1 (1895).

Male gezeigt wurde, daß es Lebewesen gibt, die mit Hilfe der bei der Oxydation anorganischer Stoffe freiwerdenden Energie im Dunkeln Kohlensäure binden können. Die Ausführung dieser Studien ist umso bewunderungswürdiger, weil die verschiedenen Formen der Schwefelbakterien, die bewegliche Beggiatoa, die unbeweglichen Thiothrixarten, die farblosen, nichtfädigen Schwefelbakterien und die roten Schwefelbakterien, bisher noch nicht in Reinkultur erhalten wurden. Die Untersuchung beschränkte sich daher auf das Verhalten in einem mit Deckglas bedeckten Tropfen auf einem gewöhnlichen Objektträger, welcher zwischen den Beobachtungen in einer feuchten Kammer gehalten wurde. Einige in den Tropfen gestreute Deckglassplitter dienten dazu, den Deckglasdruck aufzuheben, da die Bakterien sehr empfindlich sind. Auch wird so der Zutritt des für alle diese Arten nötigen Sauerstoffes erleichtert.

Rohkulturen im größeren Maßstabe erhält man, wenn man einige Stücke des zerschnittenen frischen Wurzelstockes der in jedem Teiche anzutreffenden und auch an Flußufern nicht seltenen Blumenbinse (Butomus umbellatus) samt dem daran hängenden Schlamme in ein tiefes Gefäß mit 3—5 *l* Wasser bringt und nach Zusatz von ein Paar Gramm Gips bei Zimmertemperatur unbedeckt stehen läßt. Nach Ablauf von 5—7 Tagen kann man schon die Entwicklung von Schwefelwasserstoff bemerken, welcher durch die im Schlamm enthaltenen sulfatreduzierenden Bakterien gebildet wird. Damit sind nun die Lebensbedingungen für die Entwicklung der gleichzeitig vorhandenen Schwefelbakterien geschaffen. Schon nach 3 bis 6 Wochen kann man deren Anwesenheit mikroskopisch feststellen und nach und nach vermehren sie sich so stark, daß sie auch dem unbewaffneten Auge sichtbar werden. In diesem bunten Gemisch von Schwefelbakterien fehlen gewöhnlich die roten Arten nicht, häufiger aber treten die farblosen langfädigen auf. Bezüglich der Morphologie der einzelnen Arten muß auf die Angaben von *Omelianski* in *Lafars* Handbuch verwiesen werden.

Diese Bakterien verbrennen den Schwefelwasserstoff zu freiem Schwefel, den sie häufig in großer Menge in ihren Zellen ablagern. Fehlt ihnen der Schwefelwasserstoff, so gewinnen sie ihre Lebensenergie durch fernere Oxydation des gespeicherten Schwefels zu Schwefelsäure, die durch vorhandene Karbonate neutralisiert wird. Doch können sie so nur 1 bis 2 Tage leben, dann sterben sie ab.

5. Oxydation der Thiosulfate.

Die Oxydationskraft der „Thionsäurebakterien" ist bedeutend schwächer als die der Schwefelbakterien, da sie nur imstande sind, die Thiosulfate zur Tetrationssäure und Schwefelsäure zu oxydieren. Bei ihnen findet niemals intrazelluläre Ausscheidung von Schwefel statt.

Die Isolierung solcher Bakterien gelingt, wenn man eine Auflösung von 0·1—1% unterschwefligsaurem Natrium in Seewasser oder in einer

Salzlösung folgender Zusammensetzung: 3% $NaCl$, 0·25% $MgCl_2$, 0·1% KNO_3 und 0·5% K_2HPO_4 mit Zusatz von etwas Magnesiumkarbonat, mit geeignetem Material, z. B. kleinen Mengen schwefelwasserstoffhaltigen Schlammes aus dem Meerboden in der Nähe der Küste (bei Neapel) beimpft.[1] Nach 1—2 Tagen zeigt sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein weißes Häutchen, welches zum Teil aus Tropfen öligen amorphen Schwefels, zum Teil aus einfachen, stäbchenförmigen Bakterien zusammengesetzt ist. Auf Agar mit derselben Nährlösung lassen sich die Bakterien mit gleicher Leichtigkeit wie jede andere Art auf Platten rein kultivieren, wobei die Kolonien nach 1—3 Tagen je nach der Menge des ausgeschiedenen Schwefels weiß, opak oder durchscheinend und irisierend aussehen.

Die Bakterien entwickeln sich nur in Gegenwart freier Kohlensäure oder von Karbonaten, die durch andere organische Substanzen nicht zu ersetzen sind. Hemmend wirken solche nicht in dem Maße wie bei den Schwefelbakterien. Die Oxydation erfolgt nach der Gleichung

$$3\,Na_2S_2O_3 + 5\,O = Na_2S_4O_6 + 2\,Na_2SO_4.$$

Die Schwefelausscheidung ist ein sekundärer Prozeß, veranlaßt durch die Reaktion der Tetrathionsäure auf das Thiosulfat.

Eine Süßwasserform oxydiert das Thiosulfat in anderer Weise $Na_2S_2O_3 + O = Na_2SO_4 + S$ unter Schwefelabscheidung.[2] Man isoliert sie durch Beimpfung der Nährlösung:

H_2O	100
$Na_2S_2O_3 + 5H_2O$	0·5
$NaHCO_3$	0·1
K_2HPO_4	0·02
NH_4Cl	0·01
$MgCl_2$	0·01

in dünner Schicht mit Grabenschlamm, ohne vorherige Sterilisation. Nach 2—3 Tagen bei 28—30° bedeckt sich die Oberfläche der Flüssigkeit mit freiem Schwefel, der dicht von Bakterien durchsetzt ist.

Die Reinkultur gelingt mit einem Zusatz von 2% Agar. Das Thiosulfat läßt sich durch Schwefelkalzium ersetzen. Etwas schwieriger gelingt der Versuch mit Tetrathionat nach der Gleichung

$$Na_2S_4O_6 + Na_2CO_3 + O = 2\,Na_2SO_4 + CO_2 + S_2.$$

[1] *A. Nathansohn*, Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. Mitteil. d. zool. Stat. Neapel. Bd. **15**. S. 655 (1902).

[2] *Beijerinck*, Über die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **11** (1904). S. 593.

Die gasometrische Bestimmung von primärem aliphatischen Aminostickstoff und ihre Anwendung auf physiologisch-chemischem Gebiete.

Von **Donald D. van Slyke**, Rockefeller-Institut für medizinische Forschung. New-York.

Einleitung.

Es ist seit langem bekannt, daß aliphatische Aminogruppen mit salpetriger Säure nach folgender Gleichung reagieren:

$$RNH_2 + HNO_2 = ROH + H_2O + N_2.$$

Da bei dieser Reaktion der Stickstoff in Gasform auftritt, so ist das Eintreten eines Gleichgewichtes unmöglich und der Prozeß verläuft quantitativ von links nach rechts. *Sachs* und *Kormann* [1]) haben diese Reaktion zuerst als Grundlage einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Amino-Gruppen benutzt; darnach sind noch verschiedene andere Methoden [2]), die auf demselben Vorgang basieren, bekannt geworden. Das im folgenden beschriebene Verfahren zeichnet sich jedoch vor den schon bekannten Methoden durch Einfachheit, Schnelligkeit der Ausführung und durch Genauigkeit aus, so daß das Verfahren zum allgemeinen Gebrauch in der Chemie und Biologie anwendbar ist. [3])

[1]) *Sachs* und *Kormann*, Zeitschr. f. analyt. Chemie. **14**. 380 (1875).

[2]) *König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. 4. Aufl. III. Bd. pag. 274.

[3]) Diese Methode wurde zuerst vorgetragen vor der Gesellschaft für experimentelle Biologie und Medizin, im Dezember 1909; seit dieser Zeit ist sie beständig im Gebrauch. Eine vorläufige Mitteilung über dieses Verfahren und seine Anwendung wurde veröffentlicht in den Berichten der deutsch. chem. Ges. **43**. 3170 (1910): *Donald D. van Slyke*, Eine Methodo zur quantitativen Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen; einige Anwendungen derselben in der Chemie der Proteine, des Harns und der Enzyme. Ein vollständiger Bericht erschien im Journal Biol. Chemistry **9**. 185 (1911): *Donald D. van Slyke*, A Methode for quantitative Determination of Aliphatic Amino Groups. Applications to the Study of Proteolysis and Proteolytic Products.

Die Bestimmung von Stickstoff in α-Aminosäuren kann nach der neuen Methode in wenigen Minuten ausgeführt werden. Die Fehlergrenze beschränkt sich dabei auf ± 0·1 *cm*³ Gas, das ± 0·05 *mg* Aminostickstoff entspricht.

Methode zur quantitativen Bestimmung von Aminogruppen.

Prinzip der Methode.

Die salpetrige Säure zersetzt sich in Lösung von selbst unter Bildung von Stickoxyd. Diese Reaktion wird bei der in Frage kommenden Methode benutzt, um alle Luft aus dem Apparat mittels Stickoxyds zu verdrängen. Nachdem dies geschehen ist, wird die Aminosubstanzlösung eingeführt, worauf die Entwicklung von Stickstoff und gleichzeitig von Stickoxyd stattfindet. Das Oxyd wird durch alkalische Permanganatlösung absorbiert und der reine Stickstoff darauf in einer besonderen Gasbürette, wie sie aus der Fig. 231 ersichtlich ist, gemessen.

Reagentien.

Das Permanganat wurde als absorbierendes Mittel für das Stickoxyd gewählt, nachdem alle Lösungen, welche in der Literatur für solche Zwecke empfohlen worden sind, durchgeprüft waren. Eine alkalische Permanganatlösung, wie sie ursprünglich von *Hans Meyer* angewandt wurde, gewährt in jeder Hinsicht eine vollkommen zufriedenstellende Absorptionslösung. Sie ist durchaus beständig, kann in konzentrierter Lösung gebraucht werden und oxydiert das Stickstoffoxyd zu Nitrat mit einer solchen Schnelligkeit, daß das Gas ungefähr ebenso schnell absorbiert wird, wie Kohlensäure durch Kaliumhydratlösung. Für die Bestimmungen wird zum konstanten Gebrauch vorteilhaft eine Lösung benutzt, die 50 Gramm Kaliumpermangat und 25 Gramm Kaliumhydrat im Liter enthält. Das Mangandioxyd, das sich durch Reduktion in außerordentlich feiner Verteilung bildet, beeinträchtigt nicht den Gebrauch einer *Hempel*schen Absorptionspipette für die Lösung, und es können zahlreiche Bestimmungen ausgeführt werden, ohne daß die Lösung erneuert werden muß. Um Anhaften von Mangandioxyd in Kapillaren zu verhindern, ist es empfehlenswert, bei Nichtgebrauch des Apparates (vgl. Fig. 231) das Verbindungsrohr von *G* und *H* mit Wasser zu füllen und nicht mit Permanganat stehen zu lassen. Da die alkalische Lösung sowohl Kohlensäure als auch Stickstoff absorbiert, so beeinträchtigt die Gegenwart von Carbonat in der Aminosubstanzlösung den Ausfall der Bestimmung nicht.

Für die Zersetzung der Aminosubstanz wird ein großer Überschuß von Nitrit angewandt, aus dem die salpetrige Säure durch eine äquivalente Menge einer schwachen Säure (Essigsäure) in Freiheit gesetzt wird. Der große Überschuß des Reagenzes führt die Reaktion rasch zu Ende. Der Gebrauch einer schwachen Säure an Stelle von Mineralsäuren,

die bei früheren Methoden benutzt wurden, verursacht Entwicklung von einem verhältnismäßig kleinen Volumen Stickoxyd und läßt außerdem nicht befürchten, daß bei noch komplexen proteolytischen Produkten eine Säurehydrolyse eintreten kann. Handelt es sich darum, eine in Wasser allein nicht leicht lösliche Aminosubstanz in Lösung zu bringen, so mag man Mineralsäuren gebrauchen von nicht mehr als $\frac{n}{2}$-Konzentration oder Essigsäure von irgend einer Konzentration bis zu 50%, oder endlich fixes Alkali bis zu einer Konzentration von $\frac{n}{1}$. Um Tyrosin und Lysinpikrat in Lösung zu bringen, fügt man für gewöhnlich einige Tropfen Natriumhydratlösung hinzu.

Korrektur betreffs Verunreinigung der Reagentien.

Da das käufliche Natriumnitrit oft Verunreinigungen enthält, die Spuren von Stickstoff entwickeln, wenn das salpetrige Salz angesäuert worden ist, so muß das Nitrit immer, bevor es gebraucht wird, geprüft werden; darnach wird, wenn nötig, eine Korrektur für das Reagenz angebracht, die bei den einzelnen Resultaten in Betracht zu ziehen ist.

Es sei hier erwähnt, daß z. B. ein käufliches, als chemisch rein bezeichnetes Nitrit 0·2 cm^3 Stickstoff in 5 Minuten, 0·3 cm^3 in einer halben Stunde und 0·5 cm^3 in 2 Stunden lieferte.

Der Apparat.

Die Zusammensetzung des Apparates[1]) ist aus folgender Abbildung ersichtlich:

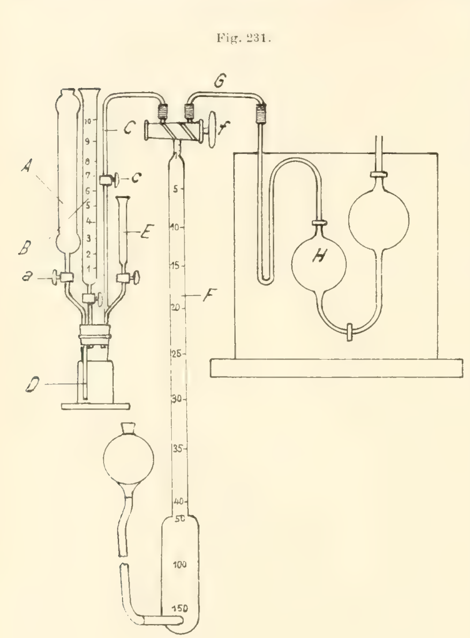
Die Reaktion wird in *D* ausgeführt, in einer Flasche von 35—37 cm^3 Inhalt. Sie ist mit einem vierfach durchbohrten Gummistopfen versehen, der beständig die Glasröhren trägt, wie es die Figur zeigt. Der Stopfen wird an seiner Stelle durch einen geeigneten Draht oder bequemer durch eine speziell für diesen Zweck konstruierte, von dem Fabrikanten gelieferte Schraubeneinrichtung festgehalten.

Alle Glasröhren, die durch den Stopfen führen, sind Kapillaren von 6—7 *mm* äußerem Durchmesser. Sie haben alle 1 *mm* lichte Weite, ausgenommen ist nur das Rohr *A*, welches 2—4 *mm* haben soll. Der Zylinder *A* von ungefähr 40 cm^3 Volumen ist mit 2 Marken versehen, welche 5 und 25 cm^3 Inhalt anzeigen. Die 10 cm^3 fassende Bürette *B* enthält die Lösung der zu analysierenden Aminosubstanz. Das Rohr *C* dient zum Auslassen des Gases und verbindet *D* mit der Gasbürette, während der Stickstoff entwickelt wird. Das untere Ende von C befindet sich genau in demselben Niveau wie die untere Fläche des Stopfens. Der kleine Zylinder *E*, von 2 cm^3 In-

[1]) Der Apparat wird geliefert von *E. Machlett and Son*, 143 E. 23 St. New York City ($ 12) und von Robert Goetze, Leipzig (M. 25).

halt. enthält etwas Amylalkohol, der dann gebraucht wird, wenn visköse Lösungen, wie solche von Proteinen, zur Analyse vorliegen. Zusatz von einem Tropfen Amylalkohol verhindert das Schäumen solcher Lösungen während der Stickstoffentwicklung. Die Gasbürette *F* ist für 40 cm^3 berechnet und in Zehntel-Kubikzentimetern eingeteilt. Unter der Marke, welche den Stand von 40 *cm* (von oben gerechnet) anzeigt, erweitert sich das Rohr sackartig; an diesem breiten Gefäß sind nur Teile von 10 Kubikzentimetern markiert. Dieser Gefäßteil faßt ein Volumen, das die zuerst in Freiheit gesetzte Menge von Stickstoff und Stickoxyd aufzunehmen imstande ist; in dem oberen engen, feiner graduierten Teil der Bürette mißt man dagegen den reinen Stickstoff, nachdem das Oxyd absorbiert worden ist. Das Wasser der Gasbürette löst etwas Stickoxyd, dadurch wird die Bürette rein gehalten, indem zufällig eingetretene Tropfen Permanganat reduziert werden. Drei Stücke Gummischläuche, aus neuem, weichem Gummi, mit kapillarer Öffnung und mit einer Wandung von 3 oder 4 *mm* Dicke verbinden *C* und *G* mit der Gasbürette. In der *Hempel*schen Pipette befindet sich die Absorptionslösung, nämlich die bereits beschriebene alkalische Permanganatlösung.

Fig. 231.



Wenn sich die Röhren der Pipette nach langem Gebrauche mit Mangandioxyd beschlagen haben, so werden sie davon mittelst Natriumsulfatlösung und verdünnter Salzsäure gereinigt.

Sind zahlreiche Aminosubstanzen nach der beschriebenen Methode zu untersuchen, so ist es vorteilhaft, je 2 Stück von den 35 cm^3-Flaschen (beide mit Stopfen versehen), von den 10 cm^3-Büretten usw. zu gebrauchen. Während nun eine Bestimmung ausgeführt wird, kann bereits eine andere begonnen werden. Auf diese Weise kann man sechs gewöhnliche (α-Amino-) Bestimmungen in einer Stunde vornehmen.

Die Bestimmung.

Der ganze Prozeß der Bestimmung ist in drei Etappen einzuteilen: 1. Vertreibung der Luft aus dem Apparat durch eine Atmosphäre reinen Stickoxyds; 2. Zersetzung der Aminosubstanz; 3. Absorption von Stickoxyd und Messen des reinen Stickstoffes. Die vollständige Bestimmung erfordert im allgemeinen ungefähr zehn Minuten.

Vertreibung der Luft durch Stickoxyd. Die Lösung der Aminosubstanz, die nicht mehr als 20 *mg* Aminostickstoff enthalten soll, wird in die Bürette *B* eingefüllt; in *A* werden 5 cm^3 Wasser gegeben. Dann gießt man in *D* 28 cm^3 der Natriumnitritlösung (30 *g* Nitrit auf 100 cm^3 Wasser) und hierauf 7 cm^3 (1/4 Vol.) Eisessig, worauf sogleich eine schnelle Entwicklung von Stickoxyd beginnt. Nun setzt man den Gummistopfen, der die verschiedenen Glasröhren trägt, in den Hals von *D* ein und befestigt ihn an der Flasche mittelst des Drahtes bzw. der Schrauben. Der Hahn *c* des Verbindungsrohres *C* muß von Anfang an offen sein. Um das noch vorhandene geringe Volumen Luft aus *D* zu vertreiben, läßt man aus *A* Wasser zufließen, bis die Flasche *D* vollständig angefüllt ist und bis die Flüssigkeit bereits in *C* aufsteigt. Um auch die in der salpetrigen Säurelösung gelöste Luft zu entfernen, schließt man nun den Hahn *c*, öffnet *a* und schüttelt *D*, während man die Röhren *A*, *B* und *C* an den oberen Enden mit der linken Hand hält. Das Schütteln verursacht eine schnelle Entwicklung von Stickoxyd, das sich in dem oberen Teil von *D* sammelt und 10—15 cm^3 der Lösung nach *A* zurück treibt. Der Hahn *c* wird jetzt wieder geöffnet und das Stickoxyd, zusammen mit der Luft, die es aus der Lösung getrieben hat, durch die aus *A* eintretende Flüssigkeit aus *D* entfernt. Um sich zu vergewissern, daß jede Spur Luft vertrieben ist, schließt man *c* und wiederholt den ganzen Prozeß noch einmal. Nachdem man nun wieder *c* geschlossen hat, schüttelt man *D* ein drittes Mal und läßt in *D* einen Gasraum von ungefähr 20 cm^3 entstehen, damit für die Aminosubstanzlösung aus *B* Raum geschaffen wird. Nun schließt man *a*, öffnet *c* und verbindet *C* mit der Gasbürette *F*, die bereits mit Wasser bis zum oberen Ende des Verbindungsschlauches gefüllt ist. Dann öffnet man den Hahn *f* zur Verbindung von *F* und *D*. Die eben beschriebenen Handhabungen erfordern ungefähr zwei Minuten.

Zersetzung der Aminosubstanz. Nachdem *C* und *F* verbunden sind, läßt man die Aminosubstanzlösung von *B* in *D* einfließen und mischt sie durch Schütteln mit der salpetrigen Säurelösung. Es beginnt sofort eine schnelle Entwicklung von Stickstoff, dem Stickoxyd beigemischt ist. Nachdem die Reaktion, falls α-Aminosäuren vorliegen, 5 Minuten gedauert hat oder, bei den meisten anderen Aminoderivaten, etwas länger, wird die Entwicklung des Stickstoffes durch kräftiges Schütteln von *D* zu Ende geführt.

Wenn Proteine oder andere Substanzen, die visköse Lösungen erzeugen, in der Aminosubstanzlösung vorhanden sind, läßt man gelegent-

lich einen Tropfen Amylalkohol aus *E* (vgl. Fig. 231) hinzufließen, um das Schäumen während der schnellen Stickstoffentwicklung zu verhindern. Falls man bei einem Verdauungsversuch die Bestimmung von Proteinen oder ihren partiellen Hydrolysenprodukten vornimmt, erfordert die Reaktion nach Versuchen mit verschiedenen Polypeptiden[1]) nur 5—10 Minuten, wenn man die Lösung durch mehrmaliges Schütteln je eine Minute lang gut durchmischt. Unter diesen Bedingungen scheint durchaus keine Gefahr für eine andere Zersetzung der komplexen Substanzen als die der Desamidierung zu bestehen. Die desamidierten Produkte der Proteine und ihrer primären Hydrolysenprodukte, sowie der höchstmolekularen Polypeptide sind unlöslich. Infolgedessen entstehen bei der Einwirkung der salpetrigen Säure auf Lösungen der unverdauten Proteine oder auf Produkte des ersten Stadiums der Verdauung, sowie auch auf sehr hochmolekulare künstliche Polypeptide Niederschläge. Diese Fällung wirkt in keiner Weise störend auf die Bestimmung ein. Falls Ammoniak vorliegt, das nicht so schnell wie primäre Aminogruppen reagiert, werden während des Verlaufes der 5 Minuten bei 20° ungefähr nur 15% seines Stickstoffs in Freiheit gesetzt.

Absorption des Stickoxydes und Messung des Stickstoffes. Nachdem die Reaktion beendet ist, öffnet man den Hahn *a*, stellt die Birne sehr niedrig und läßt dadurch alles Gas aus *D* und *C* in *F* eintreten. Dann hebt man die Birne hoch und treibt hierdurch das Gas aus *F* in *H*, wobei man sorgfältig darauf achtet, daß nichts in der Verbindungskapillare von *G* und der Pipette zurückbleibt. Das Stickoxyd wird durch Schütteln des Gases mit der Permanganatlösung absorbiert. Der reine Stickstoff wird dann in *F* zurückgeführt, indem man die Permanganatlösung durch *G* bis *f* fließen läßt. Die Oberfläche des Wassers in der Birne wird darauf in dasselbe Niveau des Meniscus der Flüssigkeit in *F* gebracht und das Volumen des Gases in *F* abgelesen. Die Absorption erfordert gewöhnlich ungefähr 1 Minute; die Absorptionsdauer ist etwas von dem Volumen des Stickstoffes abhängig, ferner kommt es darauf an, ob die Permanganatlösung frisch ist, und ob man vollständig durchgeschüttelt hat. Für den Anfang, wenn man noch nicht geübt ist, ist es ratsam, sich genau zu überzeugen, ob die Absorption vollständig vor sich gegangen ist. Zu diesem Zwecke wiederholt man die zum Absorbieren erforderliche Operation und sieht zu, ob sich danach das Gasvolumen vermindert hat. Dann bestimmt man die Zimmertemperatur neben dem Apparat und den Atmosphärendruck und berechnet aus diesen Daten und dem abgelesenen Volumen das Gewicht des Stickstoffgases nach den gewöhnlichen Tabellen zur Bestimmung des über Wasser gemessenen Stickstoffes. Da bei der Reaktion die doppelte Menge des Stickstoffes der vor-

[1]) Nach noch unveröffentlichten Versuchen von *Emil Abderhalden* und *D. van Slyke* in der Zeitschrift für physiologische Chemie.

handenen Aminogruppen zur Messung gelangt, so sind die erhaltenen Resultate an Stickstoffgewicht durch 2 zu dividieren. Es erzeugt jedes Milligramm Aminostickstoff je nach dem herrschenden Drucke und der Temperatur 1·7—1·9 cm^3 Stickstoffgas. Da also durch die Verdoppelung das zu messende Stickstoffvolumen relativ hoch ist, so kann man auch mit verhältnismäßig kleinen Mengen Substanz sehr genaue Resultate erzielen. Auf Grund seiner Genauigkeit und der bequemen und schnellen Ausführung ist die Methode für die analytische Prüfung der Reinheit von Aminosäuren außerordentlich empfehlenswert.

Bei der oben beschriebenen Methode besteht die einzige Fehlergrenze, vorausgesetzt daß die Reagentien rein sind, darin, daß die 0·2 cm^3 Luft, welche die 10 cm^3 der Aminosubstanzlösung bei dem gewöhnlichen Atmosphärendruck gelöst enthalten, in Betracht zu ziehen sind. Da aber der Sauerstoff dieser Luft sich mit dem Stickoxyd (NO) unter Bildung von Stickstoffdioxyd (NO_2) verbindet, welches durch das Permanganat absorbiert wird, sind also in Wirklichkeit nur 0·16 cm^3 Stickstoffgas zu dem zur Messung gelangenden Gasvolumen hinzugefügt. Die Korrektur, die sich dann bloß auf 0·09 *mg* Aminostoff beläuft, kann übrigens vermieden werden, wenn man zur Darstellung der Aminosubstanzlösung Wasser benutzt, das durch vorheriges Kochen oder durch kurzes (wenige Sekunden langes) Schütteln in einer evakuierten Flasche luftfrei gemacht worden ist. Einfacher bestimmt man die gesamte erforderliche Korrektur sowohl für Luft als auch für Reagentien, indem man eine Kontrollbestimmung ausführt, bei der man anstatt der Aminosubstanzlösung nur 10 cm^3 Wasser benutzt.

In betreff der Korrektur, die auf Grund von unreinen Reagentien in Betracht gezogen werden muß, sei hier auf den Abschnitt „über Reagentien" verwiesen.

Die Zeit, die bei verschiedenen Arten von Aminoderivaten zur Erlangung der quantitativen Reaktion erforderlich ist.

Die Aminogruppen, die sich in der α-Stellung zum Carboxyl befinden, wie z. B. in den natürlichen Aminosäuren, reagieren bereits in 5 Minuten bei 20° quantitativ. Die ε-Aminogruppe im Lysin erfordert eine halbe Stunde zur vollständigen Reaktion. Lysin ist die einzige natürliche Aminosäure, die mehr als 5 Minuten für den Reaktionsverlauf verlangt. Ammoniak und Methylamin brauchen 1½—2 Stunden zur quantitativen Reaktion und Harnstoff erfordert dazu sogar 8 Stunden. In 1 Stunde liefert er 50% seines Stickstoffes. Der Reaktionsgang entspricht einer monomolekularen Gleichung. Die Aminogruppen in Purinkörpern und in Pyrimidinen verlangen 2—5 Stunden bei 20°.

Im Falle aus irgend einem Grund Zweifel bestehen, ob die Reaktion sich auch vollständig abgespielt hat, kann man, wie folgt, prüfen. *C* und *F* werden verbunden gelassen, *a* geöffnet, während das Stickoxyd absorbiert und darauf der Stickstoff gemessen wird. Das Gas, das sich dann inzwischen im oberen Teile des Gefäßes *D* angesammelt hat, wird zu-

sammen mit dem, welches aus der Lösung in *D* durch Schütteln entfernt werden kann, in *F* eintreten gelassen und dann vom Stickoxyd durch Absorption befreit. Hierauf wird der Stickstoff nochmals gemessen. Wenn jetzt keine Vermehrung des ursprünglichen Stickstoffvolumens festzustellen ist, so war die Reaktion bereits vor der ersten Messung vollständig gewesen.

Die Reaktionsfähigkeit der verschiedenen Arten von Aminosubstanzen unter den Bedingungen der Bestimmung.

Aminosäuren. Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Phenylalamin, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystin, alle diese Säuren enthalten nur α-Aminostickstoff und reagieren mit ihrem gesamten Stickstoff in 5 Minuten unter den gewöhnlichen Bedingungen. Lysin erfordert, wie bereits erwähnt, 30 Minuten bei 20° zur vollständigen Reaktion, weil die ε-Aminogruppe träger reagiert als die α-Gruppe; die Resultate sind dabei aber doch gänzlich zuverläßlich. Die Guanidingruppe reagiert, trotzdem sie ein Stickstoffatom enthält, das im großen und ganzen doch die Eigenschaften einer NH_2-Gruppe besitzt, gar nicht, sowohl im Guanidin selbst als auch im Kreatin und im Arginin. Infolgedessen reagiert im Arginin von den vier Stickstoffatomen nur eins, und zwar das Stickstoffatom in α-Stellung. Der Stickstoff des Indolringes im Tryptophan, der des Pyrrolidinringes im Prolin und Oxyprolin und ferner des Imidazolkerns im Histidin reagiert nicht. Die Diaminotrioxydodekansäure von *Abderhalden* ist nicht untersucht worden; sie ist aber übrigens nur einmal aufgefunden worden und ist daher auch nicht als ein gewöhnlicher Bestandteil der Proteine zu betrachten. Fassen wir die an Aminosäuren gesammelten Resultate zusammen, so ergibt sich folgendes: Jede bekannte Aminosäure, die aus Eiweiß durch Säurehydrolyse erhalten worden ist, reagiert quantitativ mit einem Stickstoffatom, ausgenommen ist dabei bloß das Lysin, das mit zwei Stickstoffatomen reagiert, und das Prolin und Oxyprolin, die überhaupt nicht in Reaktion treten. Alle Aminosäuren reagieren mit ihrem gesamten Stickstoff mit Ausnahme des Tryptophans, das mit der Hälfte, des Histidins, das mit einem Drittel, des Arginins, das mit einem Viertel des gesamten Stickstoffs reagiert, und des Prolins und Oxyprolins, die, wie erwähnt, gar nicht reaktionsfähig sind.

Asparagin reagiert nur mit seiner primären Aminogruppe, dagegen selbst im Verlauf einiger Stunden nicht mit seinem Säureamidstickstoff.

Die Analysenresultate sind mittelst des beschriebenen Verfahrens bei allen Aminosäuren mit Ausnahme des Glykokols und des Cystins absolut genau. Die beiden genannten Säuren unterliegen einer tieferen Zersetzung als nur der Desamidierung, da sie Spuren von CO_2 und auch von Gasen liefern, die nicht durch alkalische Permanganatlösung absorbiert werden. Das Gas, das vom Glykokoll geliefert wird, beträgt gewöhnlich

103% der theoretisch berechneten Menge, so daß also bei den Glykokollanalysen 19·2% Stickstoff anstatt 18·69% erhalten werden. Mit Cystin erhält man 107% des theoretischen Gasvolumens; die Analyse liefert hier also 12·5 anstatt 11·66% Stickstoff. Das Resultat ist hierbei dasselbe, ob man die Reaktion nur 5 Minuten oder eine halbe Stunde verlaufen läßt. Es geht ohne weiters daraus hervor, daß die vollständig anormale Zersetzung des Cystins während der ersten 5 Minuten stattfindet. Daraus dürfte geschlossen werden, daß das überschüssige Gas nicht von der Zersetzung der Oxysäure, die durch Desamidierung geliefert wird, herstammt, sondern viel wahrscheinlicher von einer anormalen teilweisen Zersetzung des sich intermediär bildenden Diazokörpers.

Polypeptide. Die salpetrige Säure reagiert meist normalerweise mit Polypeptiden nach folgender Gleichung:

$$\begin{array}{llllll} R-CO.N & R'.COOH + 2HNO_2 = R & CO.N & R'COOH + 2H_2O + N_2 \\ NH_2 \quad\quad H & & OH & NO & \end{array}$$

Das Stickstoffgas wird dabei nur durch Reaktion mit der einen freien NH_2-Gruppe entwickelt; der sekundäre Stickstoff der Polypeptide wird unter Bildung von Nitrosamingruppen gebunden und bleibt infolgedessen, soweit es für unsere gasvolumetrische Bestimmung in Betracht kommt, inaktiv. Dies wurde an einer großen Zahl verschiedenartiger Polypeptide festgestellt. Eine Ausnahme hiervon wurde nur an Glycylpolypeptiden beobachtet, bei denen die NH_2-Gruppe sich am Glycinrest befindet. Solche Polypeptide geben, unabhängig von der Länge der Kette, statt 1 Molekül 1·25 Molekül Stickstoff ab. Offenbar hängt dieser abnorme Reaktionsverlauf mit dem anormalen Verhalten, welches das Glycin selbst bei der Reaktion zeigt, zusammen.[1])

Proteine und intermediäre proteolytische Produkte. Die natürlichen Eiweißkörper reagieren nur mit einer Spur ihres Stickstoffgehaltes, die jedenfalls zum Teil der ε-Aminogruppe des Lysins entstammt.[2]) Die primären Produkte der Hydrolyse enthalten mehr freie Aminogruppen und bei den sekundären ist diese Menge noch reichlicher. So reagiert z. B. Eieralbumin nur mit 2·98% seines Stickstoffs und Edestin mit 2·47%. Heteroalbumose[3]) und Protoalbumose reagieren je mit 6·3% und die Deuteroalbumosen mit 10—14% ihres Stickstoffs. Diese Resultate sind vereinbar mit der *Fischer*schen Theorie über die Struktur des Eiweißes, nach der bekanntlich die kleineren Moleküle den größeren Teil ihres Stickstoffs in Form von freien Aminogruppen besitzen.

---

[1]) Vgl. die demnächst in der Zeitschrift für physiol. Chemie von *Emil Abderhalden* und *D. van Slyke* erscheinende Arbeit.

[2]) *S. J. Levites*, Über die Desamidoproteine. Biochem. Zeitschr. **20**. 224 (1909). — *Zd. Skraup*, Annalen der Chemie und Pharmazie **360**. 379 (1906). — *Zd. Skraup*, Annalen der Chemie und Pharmazie. **360**. S. 379 (1906).

[3]) *P. A. Levene*, *D. D. van Slyke* and *F. J. Birchard*, The Partial Hydrolysis of Proteins. Journal of Biol. Chem. **8**. 272 (1910).

Purin- und Pyrimidin-Riboside.[1]) Diese Komplexe sind deshalb von Interesse, weil sie in Verbindung mit Phosphorsäure mindestens eine Klasse von Nukleinsäuren zusammensetzen. Man fand, daß Cytidin (Cytosin-Riboside) und Adenosin (Adenin-Riboside) in zwei Stunden oder mehr genau die Menge Stickstoffgas liefern, die sich für eine Aminogruppe berechnet.[2]) Dagegen verhält sich Guanosin gleich dem Cystin abnorm und liefert $1^1/_3$ Atome des vorhandenen Stickstoffs.

Messung der Schnelligkeit und des Umfanges der Proteolyse mittelst der Aminostickstoffbestimmung.

Wie *Emil Fischer* und seine Schüler gezeigt haben, sind die Eiweißkörper als Ketten von Aminosäuren, wie sie in Polypeptiden vorkommen, zu betrachten. Bei der Hydrolyse werden die CO– NH-Verbindungen gesprengt, indem dabei aus jeder Verkettung eine freie Aminogruppe entsteht. Infolgedessen ist in einem partiell hydrolysierten Protein das Verhältnis des schon in Freiheit gesetzten Aminostickstoffs zu dem durch vollständige Hydrolyse freigemachten ein Maß für die Menge der gespaltenen Peptidverkettungen oder für den Umfang der stattgefundenen Hydrolyse.

Die bisher ausgeführten Versuche sind ganz im Einklang mit der *Fischer*schen Erklärungsweise über die Struktur der Eiweißkörper ausgefallen und zeigen, daß der Verlauf der Proteolyse in geeigneter Weise durch die Aminobestimmungen verfolgt werden kann. Außer der Bequemlichkeit, mit welcher dieses Verfahren ausführbar ist, hat es noch vor den beim Studium der Proteolyse bis jetzt allgemein gebrauchten empirischen Methoden, wie Fällung mit Gerbsäure, Aussalzen, Viskositätsmessungen usw. den Vorteil, daß es eine direkte genaue chemische Auslegung der Resultate zuläßt: es gibt die Menge der gespaltenen Peptidbindungen an. Der Umfang der stattgehabten Hydrolyse wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Prozent der Hydrolyse} = \frac{100\,(A - A_0)}{A_1 - A_0}$$

A bedeutet dabei den jeweils gefundenen Aminostickstoff, A_0 den Aminostickstoff des unangegriffenen Proteins vor der Hydrolyse, A_1 den Aminostickstoff nach vollständiger Hydrolyse.[3])

---

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs:* Über die Hefe- und Nukleinsäure. III. Ber. der Deutsch. Chem. Gesellsch. **43**. 3150 (1910).

[2]) *Donald D. van Slyke*, Journal of Biol. Chemistry **9**. 195 (1911) loc. cit.

[3]) Da A_0 verhältnismäßig klein ist, kann es bei der Berechnung unberücksichtigt bleiben, falls die Bedingungen eine experimentelle Bestimmung seines Wertes verhindern, wie z. B., wenn das unverdaute Eiweiß unlöslich ist; annähernde Resultate werden dann nach der Gleichung erhalten:

$$\text{Hydrolyse} = \frac{100\,A}{A_1}.$$

Tabelle I.

Verdauung von Edestin durch Trypsin.

150 *cm*³ Wasser, 6 *g* lufttrockenes Edestin, 0·5 *g* Soda, 0·6 *g* *Grüblers* Trypsin. Temperatur 37°. Von Zeit zu Zeit wurden 5 *cm*³ für die Aminostickstoff-Bestimmung entnommen.

Stunden	Kubikzentimeter N-Gas, reduziert auf 0° u. 760 *mm*	Prozente von N	Umfang der Hydrolyse in Prozent
0	1·97 [1]	3·68 [1]	0·00
2	7·62	14·93	14·77
4	8·92	17·47	18·15
20	12·62	24·75	27·40
80	19·56	38·35	47·30
Vollständige Hydrolyse mittelst Salzsäure	40·25	79·00	100·00

Tabelle II.

Hydrolyse von Eieralbumin durch Natronlauge.

100 *cm*³ H_2O, 2 *g* lufttrockenes Albumin, 5 *g* NaOH, Temperatur 60°. Für die Aminostickstoffbestimmung wurden je 5 *cm*³ entnommen.

Stunden	Kubikzentimeter N-Gas, reduziert auf 0° u. 760 *mm*	Prozente des Total-N	Umfang der Hydrolyse in Prozent
0	0·78	2·85	0·00
0·5	1·85	7·15	5·19
4·5	5·04	19·45	19·95
25	10·11	39·02	43·70
48	12·09	46·62	53·02
96	15·85	61·10	70·70
144	17·75	68·42	83·20
Vollständige Hydrolyse mittelst Salzsäure	22·10	85·20	100·00

Zur vollständigen Hydrolyse werden die Proteine am Rückflußkühler mit 20%iger Salzsäure (1 Vol. Wasser und 1 Vol. konzentrierte Salzsäure) gekocht, bis die Menge des Aminostickstoffs das Maximum erreicht hat. Dieser Punkt wird bequem so bestimmt, daß man in Intervallen von einigen Stunden mit einer Pipette abgemessene Proben, die ungefähr 0·1 *g* Stickstoff enthalten, entnimmt und diese für die Aminobestimmungen auf je 10 *cm*³ verdünnt. Falls die Proben mehr als 1·00 *cm*³ betragen, soll

[1]) 0·77 *cm*³ des Stickstoffs oder 1·5% entstammen dabei dem Aminostickstoff des zugefügten Trypsins. Vom Edestin selbst reagieren nur 2·4% Stickstoff mit der salpetrigen Säure. Da das zugesetzte Trypsin reich an Stickstoff war, können nicht 79% als die Menge des Aminostickstoffs in hydrolysiertem, reinen Edestin angenommen werden.

die Säure mit einer konzentrierten Lösung von Alkali neutralisiert werden, ehe sie bis auf 10 cm^3 verdünnt wird. Der Kolben, in dem die Lösung gekocht wird, soll tariert sein und vor der Entnahme einer jeden Probe gewogen werden, um die Konzentrationsänderung der Lösung, die durch Verdampfung durch den Rückflußkühler vor sich gehen kann, festzustellen.

Die oben beschriebene Methode zur Verfolgung des Verlaufes der Hydrolyse eignet sich sehr gut zur Bestimmung der relativen Leichtigkeit, mit der verschiedene Eiweißkörper durch Säuren, Alkalien oder Fermente hydrolysiert werden und sie dürfte ferner ein geeignetes Mittel zur Feststellung der Wirksamkeit von proteolytischen Fermenten sein.

Quantitative Bestimmung des Prolins, das nach der Estermethode bei der Protein-Hydrolyse erhalten wird.

Der Prolingehalt kann schnell und genau durch Bestimmung des totalen und des Amino-Stickstoffs des in Alkohol löslichen Gemisches von Aminosäuren festgestellt werden. Jede Aminosäure, deren Ester mit dem Prolinester überdestilliert, gibt bei der Behandlung mit salpetriger Säure bei der oben beschriebenen Aminobestimmung allen Stickstoff ab. Prolin reagiert hierbei dagegen gar nicht. Infolgedessen kann man den Prolingehalt der Mischung durch Subtraktion des Aminostickstoffs vom totalen Stickstoffgehalt bestimmen, die erhaltene Differenz bezieht sich also auf den Prolinstickstoff.[1])

Untersuchung von Verdauungsgemischen.

Die Aminostickstoffbestimmung ist mit Vorteil bei Untersuchung des Inhalts des Verdauungskanales benutzt worden, um die Verdauung von Eiweißkörpern zu verfolgen.[2]) Der Inhalt der einzelnen abgetrennten Teile des Verdauungskanals wird durch Zentrifugieren von den festen Bestandteilen befreit und auf die gleiche Weise gewaschen. Dann bestimmt man den Stickstoff der Lösung und der unlöslichen Teile. In der Lösung wird auch der Aminostickstoffgehalt festgestellt. Hiernach mischt man einen aliquoten Teil der Lösung mit einem gleichen Volumen konzentrierter Salzsäure und hydrolysiert vollständig durch Kochen. Die hydrolysierte Lösung wird dann von der überschüssigen Salzsäure durch Abdampfen befreit und der Rückstand auf ein bestimmtes geeignetes Vo-

[1]) Für die Anwendung der Methode bei der Hydrolyse des Kaseins vgl. *van Slyke*, Ber. der Deutsch. Chem. Ges. **43**. 3174 (1910) loc. cit.; *D. D. van Slyke*, Quantitative Determination of Prolin obtianed by the Ester Method in Protein Hydrolysis. Prolin Content of Casein. Journal of Biolog. Chem. **9**. 205 (1911); *Osborne* und *Guest*, Hydrolysis of Casein. Journal of Biolog. Chem. **9**. 344 (1911).

[2]) *Van Slyke* und *White*, Digestion of Protein in stomach and intestine of the dogfish. Journal of Biolog. Chem. **9**. 209 (1911).

lumen gebracht, worauf in aliquoten Teilen die Aminobestimmungen ausgeführt werden. Anstatt die Lösung einzudampfen, kann man auch einfach vollständig mit Natronlauge neutralisieren, dann auf ein abgemessenes Volumen bringen und die Bestimmung vornehmen. Man erhält dabei das Verhältnis von (Aminostickstoff nach Hydrolyse):(Aminostickstoff vor Hydrolyse), das die Durchschnittsgröße der Polypeptide — in bezug auf Aminosäure-Radikale — in der Verdauungslösung angibt. Hierdurch erhält man ein bestimmtes chemisches Kennzeichen über die Ausdehnung der stattgehabten Verdauung.

Die obige, bei der zitierten Arbeit gebrauchte Technik ist die einfachste Methode zur Behandlung des fraglichen Problems. Dieses Verfahren könnte so vervollkommnet werden, daß man die Peptone mit Phosphorwolframsäure — so wie es von *Abderhalden* ausgeführt wurde — oder mit Gerbsäure ausfällt. Sowohl der Niederschlag als auch das Filtrat kann dann auf Gesamtstickstoff und auf Aminostickstoff vor und nach der Hydrolyse analysiert werden. Noch weiteren Aufschluß würde man bei Anwendung der im nächsten Abschnitt beschriebenen Methode zur Analyse der Proteine erhalten, und zwar unter Ausdehnung derselben sowohl auf den Niederschlag als auch auf das Filtrat. Dabei würde bestimmt werden, welcher Teil des ursprünglichen Eiweißmoleküls in der Fällung und auch im Filtrat vorhanden war. Man kann dadurch die Anteile, die schneller hydrolysiert worden sind, und die, welche widerstandsfähiger waren, bestimmen.

Bestimmung des Aminostickstoffes im Urin.

A. Gesamtaminostickstoff im Urin.[1])

Die Methode besteht darin, daß man den Urin mit Schwefelsäure unter Druck erhitzt, wodurch der Harnstoff zu Ammoniak[2]) zersetzt wird und durch vollständige Hydrolyse die Aminosäuren, die in Form von Eiweiß, Peptonen, Hippursäure usw. gebunden sind, gleichzeitig freigemacht werden. Das Ammoniak wird dann abdestilliert. Bei diesem Verfahren werden also Ammoniak und Harnstoff entfernt, die sonst teilweise mit den Aminosäuren bestimmt würden. Dann stellt man den Aminostickstoff fest. — Die Methode wird wie folgt ausgeführt:

Zu 75 *cm* Urin, in einem Reagensglas von 100—110 cm^3 Inhalt befindlich, fügt man 25 cm^3 konzentrierte Schwefelsäure. Der Urin wird dann in einem Autoklaven auf 175° für 1½ Stunden erhitzt. Darauf wird er in einen Jenaer Erlenmeyerkolben von 300 cm^3 Inhalt gespült, mit 6—7 *g* $Ca(OH)_2$ versetzt und bis zum Verschwinden allen Ammoniaks gekocht. Man prüft hierzu die Dämpfe mittelst Lackmuspapieres. Um das Schäumen während des Kochens zu vermeiden, fügt man ein Stückchen Paraffin

[1]) *Donald D. van Slyke*, Bericht d. Deutsch. chem. Gesellsch. 43. 3179 (1910); l. c.
[2]) *Benedict* und *Gebhart*, Journ. Americ. Chemic. Soc. 1909. *Levene* und *Meyer*, idem

von Bohnengröße hinzu. Wenn die Lösung ammoniakfrei ist, filtriert man durch einen Faltenfilter in eine Abdampfschale und wäscht dann den Calciumhydrat- und -sulfatniederschlag zehnmal mit heißem Wasser. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad fast, aber nicht ganz, zur Trockne verdampft. Da die Lösung sehr wenig Substanz gelöst enthält, so geht die Verdampfung rasch vor sich und ist in ungefähr 2 Stunden vollendet. Die Lösung wird dann von der geringen Menge der sich abgeschiedenen Calciumsalze durch ein kleines Filter in einen 25 cm^3-Kolben filtriert, der Rückstand in der Schale und das Filter werden mehrere Male mit Wassermengen von je 3—5 cm^3 ausgewaschen. Der 25 cm^3-Meßkolben wird darauf bis zur Marke mit Wasser gefüllt. Dann werden je 10 cm^3 für zwei Aminostickstoffbestimmungen entnommen, von denen jede wie gewöhnlich in 5—6 Minuten ausgeführt ist. Die Kontrollbestimmungen geben für gewöhnlich sehr genau übereinstimmende Resultate.

Um die Urine für die Aminobestimmungen vorzubereiten, ist ein voller Arbeitstag erforderlich. Es können aber zu gleicher Zeit so viele Proben auf einmal präpariert werden, wie der Autoklav aufnehmen kann, und außerdem erfordert das Erhitzen im Autoklaven und auf dem Wasserbade, das die meiste Zeit in Anspruch nimmt, keine besondere Aufmerksamkeit. Bei der Ausführung der Aminobestimmungen einer Serie von Proben wird sehr viel Zeit gespart, wenn man zwei Zersetzungsflaschen (*D* in der Fig. 231) mit je den entsprechenden Röhren (Büretten usw.) zur Verfügung hat.

Es kann mit ziemlicher Bestimmtheit angenommen werden, daß der nach obiger Methode bestimmte Aminostickstoff aus den α-Aminosäuren stammt. Dafür spricht der schnelle Verlauf der Reaktion mit salpetriger Säure, der als charakteristisch für die in α-Stellung zum Carboxyl befindlichen Aminogruppen anzusehen ist.

Normaler menschlicher Urin enthält 1·5—2·5% seines Stickstoffs in Form von freien und gebundenen Aminosäuren. Untersuchungen einer Serie pathologischer Harne haben bisher Abnormalitäten nur in Fällen von Nephritis nachgewiesen, die natürlich auf Grund des Eiweißes höhere Resultate ergeben müssen. In einigen derartigen Fällen waren 20% des Totalstickstoffes in dieser Form vorhanden, der Überschuß war gänzlich auf hydrolysierte Aminosäurekomplexe zurückzuführen, da die Menge der freien Aminosäuren normal war.

B. Freier Aminostickstoff im Urin.[1])

Von den zwei stickstoffhaltigen Substanzen, Ammoniak und Harnstoff, die bei der Bestimmung des α-Aminostickstoffs störend wirken können, muß der Ammoniak entfernt werden. Der Harnstoff reagiert nämlich so langsam, daß nur ungefähr 3% desselben in 5 Minuten bei 20° zersetzt werden. Der Prozeß verläuft gemäß der gewöhnlichen monomolekularen Reak-

[1]) *Donald D. van Slyke*, Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **43**. 3170 (1910); l. c.

tion selbst bei Gegenwart von reagierenden Aminosäuren (durch den großen Überschuß von Nitrit wird die Konzentration desselben nahezu konstant gehalten). Dieser Umstand ermöglich es[1], die Bestimmung des Aminosäurestickstoffs vorzunehmen, ohne den Harnstoff vorher zu entfernen, so daß also eine hydrolytische Behandlung unnötig ist. Die so erhaltenen Resultate sind natürlich nicht an Genauigkeit mit denjenigen vergleichbar, die erzielt werden, wenn der Harnstoff vorher entfernt worden ist. Sie sind aber doch bis 0·3% des Gesamtstickstoffs des Urins zuverlässig und genügend, um irgend eine erhebliche Vermehrung des Aminostickstoffs nachzuweisen. Die Methode wird, wie folgt, ausgeführt:

100 *cm*³ Urin werden mit 4 *g* Natriumhydrat versetzt und mittelst mehrstündigen Durchleitens eines kräftigen Luftstroms vom Ammoniak befreit. Es ist ziemlich schwierig, das Ammoniak auf diese Weise vollständig zu verjagen. Die zurückbleibenden Spuren beeinflussen aber die Resultate nicht merklich, denn das Ammoniak reagiert nur langsam mit salpetriger Säure, und infolgedessen wird es fast vollständig mit dem Harnstoff anstatt mit den Aminosäuren bestimmt.

Nachdem das Ammoniak entfernt worden ist, wird der Urin mit Essigsäure angesäuert, auf dem Wasserbade konzentriert und schließlich auf ein Volumen von 50 *cm*³ gebracht. Mit je 10 *cm*³ führt man zwei Aminobestimmungen aus, und zwar die eine genau im Verlauf von sechs Minuten, die andere während zwölf Minuten, gerechnet von dem Zeitpunkte, bei dem der Urin mit der salpetrigen Säure gemischt wird. Bei diesen Bestimmungen läßt man die Lösungen 5 und 11 Minuten lang ruhig stehen und schüttelt erst während der letzten Minuten um. Der Unterschied zwischen den beiden Resultaten repräsentiert die Menge Stickstoff, die vom Harnstoff während 6 Minuten abgegeben worden ist. Durch Subtraktion dieser Differenz von dem Ergebnis, das man bei der Bestimmung in 6 Minuten erhalten hat, wird die Stickstoffmenge, die aus den Aminosäuren stammt, gefunden.

Für die Genauigkeit des Verfahrens ist es wichtig, daß genau dieselben Volumina all' der erforderlichen Lösungen bei beiden Aminobestimmungen benutzt und daß beide bei gleicher Temperatur ausgeführt werden. Mit besonderer Sorgfalt muß man auch darauf achten, daß, nachdem die Luft im Apparat durch Stickoxyd während des ersten Stadiums der Bestimmung vertrieben worden ist, dasselbe Volumen von salpetriger Säurelösung in der Zersetzungsflasche (*D* in der Fig. 231) hinterbleibt. Dies wird leicht so bewerkstelligt, daß man die Lösung aus *D* in den Zylinder *A* genau bis zur Marke von 25 *cm*³ zurücktreibt, ehe der Urin in *D* eingelassen wird.

Falls die Temperatur unter 19° ist, muß die Zeit der Reaktion auf 7 und 14 Minuten ausgedehnt werden und bei einer Temperatur unter 15° auf 8 und 16 Minuten.

---

[1]) Dieser Gedanke wurde zuerst von Dr. *P. A. Levene* ausgesprochen.

Die folgenden Analysen eines normalen menschlichen Urins mögen als praktisches Beispiel angeführt werden.

Der Totalstickstoffgehalt für 100 *cm*³ war 1·127 *g*. Die Bestimmung des gesamten Aminostickstoffs nach der oben beschriebenen Hydrolyse im Autoklaven ergab 9·10 und 9·20, im Durchschnitt 9·15 *cm*³ Stickstoffgas bei 21° und 768 *mm* Druck. Diese von 300 *cm*³ Urin gelieferte Menge ergibt einen totalen Aminostickstoffgehalt von 0·0175 *g* für 100 *cm*³ oder von 1·53% des gesamten Stickstoffs.

Die Bestimmung des freien Aminostickstoffs gab die folgenden Resultate bei einer Temperatur von 24° und einem Druck von 768 *mm*.

12 Minutenbestimmung	6·87 *cm*³ Stickstoff
6 „	5·11 „ „
Aus dem Harnstoff in 6 Minuten geliefert	1·76 *cm*³ Stickstoff
Aus den Aminosäuren geliefert	3·35 *cm*³ Stickstoff

Diese Menge, die aus 20 *cm*³ Urin geliefert wurde, entspricht einem Gehalt freien Aminostickstoffes von 0·0095 *g* für 100 *cm*³, oder 0·8% des Gesamtstickstoffs. Der Unterschied zwischen dieser Bestimmung und der des totalen Aminostickstoffs gibt an, daß 0·7% des Stickstoffs durch Hydrolysieren im Autoklaven als Aminostickstoff abgespalten worden waren.

Die Analyse von Eiweißkörpern durch Bestimmung der chemisch charakteristischen Gruppen der verschiedenen Aminosäuren.[1]

Von **Donald D. van Slyke**, Rockefeller Inst. for med. Research, New-York.

Die im folgenden skizzierte Analyse ermöglicht durch eine Methode, die nur wenig Material erfordert und doch annähernd quantitative Resultate liefert, einen Einblick in die Zusammensetzung der Eiweißkörper zu erlangen. Sie verlangt nur 2·5—3·0 *g* Substanz und unterrichtet über die Art von 98—100% der stickstoffhaltigen Produkte der vollständigen Säurehydrolyse. Sie gestattet einerseits den Verlauf der Hydrolyse zu verfolgen und den Punkt zu bestimmen, bei welchem die letztere vollständig ist. Andrerseits schließt sie die Bestimmung folgender Produkte ein: Ammoniak, Melaninstickstoff, Arginin, Histidin, Lysin, unzerstörtes Cystin, Aminostickstoff von nicht mit Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen (die Gruppe der primären Mono-Aminosäuren, wie Leucin, Alanin usw.) und den Nicht-Aminostickstoff von Substanzen, die nicht mit Phosphorwolframsäure gefällt werden (Prolin, Oxyprolin und Indolstickstoff vom Tryptophan). Dieses Verfahren kann daher zur Untersuchung von Proteinen dienen, wenn Mengen von Material zur Verfügung stehen, die zu gering sind, um eine Isolierung der einzelnen Aminosäuren zuzulassen. Da außerdem diese Analyse quantitativ die Mengen anzeigt, welche von dem Stickstoff des Eiweißes auf die einzelnen Gruppen von Aminosäuren entfallen, kann sie zur Kontrolle der bisher isolierten Mengen der einzelnen Aminosäuren dienen.

Das Verfahren beruht auf der Bestimmung der charakteristischen chemischen Gruppen der Aminosäuren. Durch Fällung mit Phosphorwolframsäure unter genau bestimmten Bedingungen werden die Aminosäuren in zwei Fraktionen getrennt: die basischen Körper, die niedergeschlagen werden, und die anderen Aminosäuren, die nicht fallen. Die Mengen der verschiedenen Arten, die in jeder Fraktion vorhanden sind, werden durch Bestimmung der charakteristischen chemischen Gruppen festgestellt.

[1]) Übersetzt aus dem Englischen von *K. Kautzsch*-Berlin.

Die Phosphorwolframsäure wurde als Fällungsmittel der basischen Substanzen von *Drechsel*[1]) eingeführt. Er entdeckte mit ihrer Hilfe das Lysin. *Hedin* fand dann damit Arginin[2]) und Histidin[3]) unter dem Basengemisch und *Winterstein* das Cystin.[4]) *Osborne*, *Leavenworth* und *Brautlecht*[5]) zeigten später an Hand einer großen Serie von Eiweißanalysen, daß nur der Stickstoff dieser Basen, und zwar von denselben fast sämtlicher, ins Phosphorwolframat übergeht, wenn die Fällung der Produkte der vollständigen Hydrolyse in verdünnten Lösungen stattfindet. Dies konnte auch vom Verfasser[6]) bestätigt werden. Die einzige Aminosäure, die mit den obigen vier Säuren in verdünnter Lösung gefällt werden konnte, ist das Tryptophan. Kontrollversuche haben ergeben, daß es mehr als 20% eines Proteins ausmachen mußte, um nach der Hydrolyse überhaupt etwas davon unter den angewandten Bedingungen niederzuschlagen.

Prinzip der Methode.

Nach der Entfernung des Ammoniaks durch Vakuumdestillation werden Arginin, Histidin, Lysin und Cystin mit Phosphorwolframsäure niedergeschlagen. Die Fällung wird gelöst, und diese vier Basen werden auf Grund ihrer verschiedenen charakteristischen chemischen Eigenschaften bestimmt. Durch Bestimmung des Aminostickstoffs und des Gesamtstickstoffs dieser Fraktion erhält man den Nichtaminostickstoff, der die Menge des vorhandenen Histidins ($^2/_3$ Nichtamino-N) und des Arginins ($^3/_4$ Nichtamino-N) angibt. Der übrige Stickstoffgehalt der Fraktion besteht aus den zwei Basen Lysin und Cystin, die nur Aminostickstoff enthalten.[7]) Von diesen beiden Aminosäuren wird der Gehalt an Cystin durch eine Schwefelanalyse bestimmt, das Lysin durch Subtraktion des Cystins von der Summe beider Substanzen. Von dem anderen Paar Aminosäuren wird das Arginin durch Zersetzung mit Lauge, welche die Hälfte des Stickstoffs als Ammoniak abspaltet, bestimmt und der Gehalt des Histidins wieder durch Subtraktion festgestellt. Die Aminosäuren im Filtrate der Basen werden in zwei Unterfraktionen geteilt: 1. die Säuren, die nur primären Aminostickstoff enthalten; 2. diejenigen, die sekundären Stickstoff besitzen, wie er im Pyrrolidinring (Prolin, Oxyprolin) oder im Indolkern (Tryptophan) vorkommt.

---

[1]) Archiv für Anat. u. Physiologie, 1893, 254.

[2]) *S. G. Hedin*, Über ein neues Spaltungsprodukt der Hornsubstanz. Zeitschr. f. physiol. Chemie, **20**, 186 (1895).

[3]) *S. G. Hedin*, Zur Kenntnis der Spaltungsprodukte der Proteinkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie, **22**, 191 (1896).

[4]) *E. Winterstein*, Über eine Methode zur Abscheidung der organischen Basen aus den Phosphorwolframsäureniederschlägen und über das Verhalten des Cystins gegen Phosphorwolframsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **34**, 153 (1901/02).

[5]) *Osborne*, *Leavenworth* and *Brautlecht*, Different Forms of Nitrogen in Proteins. Americ. Journ. Physiol. **23**, 194 (1908).

[6]) *Donald D. van Slyke*, vgl. die demnächst im Journal of Biol. Chem. (1911) erscheinende Arbeit.

[7]) Vgl. S. 1013, Tabelle I.

Das Schema der Analyse ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich. Es ist möglich, daß in der Unterfraktion des Filtrats, die nur Aminostickstoff enthält, noch einige bis jetzt unbekannte Säuren vorkommen, denn die Hauptverluste bei der Aufarbeitung bei früheren Isolierungsversuchen sind zweifellos in diesem Anteil zu suchen. Da jedoch die Methoden, mit welchen die meisten dieser Aminosäuren isoliert werden müssen, bis jetzt unvermeidbare Verluste mit sich bringen, so kann man auch annehmen, daß die Unvollkommenheit der Resultate bei den Isolierungsmethoden nicht auf das Vorkommen von noch unbekannten α-Aminosäuren zurückzuführen ist, wie übrigens auch aus den von *Osborne* gezeitigten Ergebnissen hervorzugehen scheint. (Vgl. Tabelle I.)

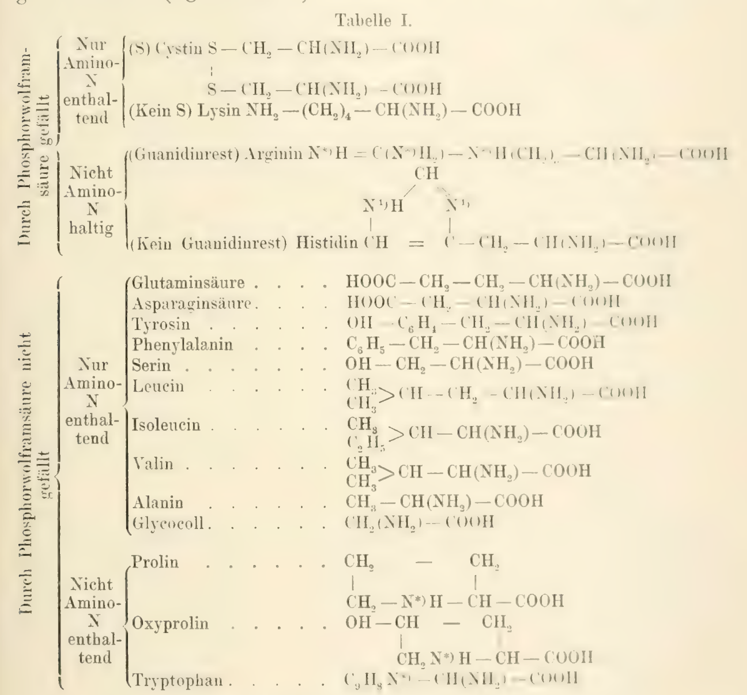


Tabelle I.

Durch Phosphorwolframsäure gefällt	Nur Amino-N enthaltend	(S) Cystin	$S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ / | / $S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		(Kein S) Lysin	$NH_2-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$
	Nicht Amino-N haltig	(Guanidinrest) Arginin	$N^{*)}H=C(N^{*)}H_2)-N^{*)}H(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$
		(Kein Guanidinrest) Histidin	$CH=C-CH_2-CH(NH_2)-COOH$, Ring: CH — $N^{1)}H$ / $N^{1)}$
Durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt	Nur Amino-N enthaltend	Glutaminsäure	$HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		Asparaginsäure	$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		Tyrosin	$OH-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		Phenylalanin	$C_6H_5-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		Serin	$OH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		Leucin	$\frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
		Isoleucin	$\frac{CH_3}{C_2H_5}>CH-CH(NH_2)-COOH$
		Valin	$\frac{CH_3}{CH_3}>CH-CH(NH_2)-COOH$
		Alanin	$CH_3-CH(NH_2)-COOH$
		Glycocoll	$CH_2(NH_2)-COOH$
	Nicht Amino-N enthaltend	Prolin	$CH_2 - CH_2$ / | | / $CH_2-N^{*)}H-CH-COOH$
		Oxyprolin	$OH-CH - CH_2$ / | / $CH_2N^{*)}H-CH-COOH$
		Tryptophan	$C_9H_8N^{*)}-CH(NH_2)-COOH$

Die ausführliche Methode.

Hydrolyse. Eine Eiweißhydrolyse ist bereits mit nur 1 *g* Substanz erfolgreich ausgeführt worden (vgl. Hämoglobin-Hydrolyse), aber im all-

[1]) Nichtaminostickstoff (mit salpetriger Säure nicht reagierend; zu dieser Stickstoffgruppe gehört auch die eine NH_2-Gruppe des Guanidinrestes vom Arginin).

gemeinen sind für eine befriedigende Durchführung 2·5 bis 3 *g* erforderlich und falls eine genügende Menge Material zur Verfügung steht, so ist es sehr empfehlenswert, die Analyse doppelt auszuführen, also 6 *g* zu gebrauchen. Das Protein wird in 10 oder 20 Teilen 20%iger Salzsäure gelöst und in einem tarierten Kolben am Rückflußkühler gekocht. Nach Verlauf von 8 oder 10 Stunden wird die Hydrolyse unterbrochen, die Lösung gekühlt, und dann werden Portionen von 1 oder 2 cm^3 (die etwa 0·1 *g* Protein entsprechen) mittelst einer empfindlichen Pipette entnommen. Die Proben werden auf 10 cm^3 verdünnt und dann zur Bestimmung des Aminostickstoffs benutzt. Die verschiedenen Bestimmungen sollen alle unter gleichen Bedingungen ausgeführt werden, da sonst durch das Ammoniak des Amidstickstoffs Irrtümer entstehen könnten. Für gewöhnlich erhält man die zufriedenstellendsten Resultate bei Ausführung der Bestimmungen in 6 Minuten, und zwar so, daß die Mischung von hydrolysiertem Eiweiß und salpetriger Säure 5 Minuten stehen bleibt und darauf eine Minute lang geschüttelt wird. Unter solchen Bedingungen, bei denen eine konstante Zimmertemperatur anzunehmen ist, wird in jedem Falle die gleiche Menge Ammoniak (15% bei 20°) zersetzt. Nachdem man dem Hydrolysengemisch die Probe für die Aminostickstoffbestimmung entnommen hat, wird der Kolben samt der zurückbleibenden Hydrolysenflüssigkeit gewogen, dann kocht man wieder 8—10 Stunden und wiegt nochmals, ehe die nächste Probe genommen wird. Durch diese Gewichtsbestimmungen stellt man die etwa durch Verdampfung entstandene Veränderung der Konzentration der Lösung fest. Falls eine Konzentration vor sich gegangen ist, so muß man eine Korrektur für die Volumverminderung in Prozenten anbringen. — Die Hydrolyse wird solange fortgesetzt, bis die Probebestimmungen einen konstanten Aminostickstoffgehalt ergeben. Dies wird gewöhnlich nach über 24 Stunden erreicht sein. Es ist unbedingt erforderlich, die Vollständigkeit der Hydrolyse (mittelst der Aminobestimmungen) zu kontrollieren, da sonst, wie *Osborne* kürzlich gezeigt hat, auf Grund unvollständiger Hydrolyse Fehlerquellen resultieren.

Bestimmung des Ammoniaks (Amid-Stickstoff). Die Bestimmung des Ammoniaks, das bei der Säurehydrolyse aus Eiweiß entsteht, verdient besondere Beachtung, seitdem *Osborne, Leavenworth* und *Brautlecht* gezeigt haben, daß der Ammoniakstickstoff gewöhnlich gleich ist dem der Dicarbonsäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, mit denen er ursprünglich im Eiweißmolekül in Form von Säureamid-Radikalen gebunden anzusehen ist.[1])

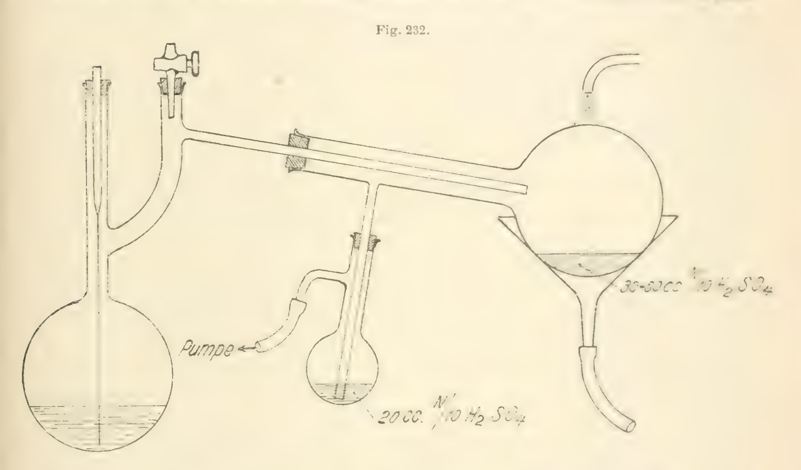
Damit die nachfolgenden Bestimmungen in keiner Weise durch noch vorhandenes Ammoniak beeinflußt werden, ist es unbedingt nötig, bei der Bestimmung des Ammoniaks jede Spur von Ammoniak zu entfernen. Die Behandlung mit Alkali muß man dabei aber so vorsichtig ausführen,

[1]) *Osborne, Leavenworth* and *Brautlecht,* Different Forms of Nitrogen in Proteins. Americ. Journ. of Biolog. **23**. **194** (1908).

daß weder das Arginin noch das Cystin angegriffen werden. Wie *Denis*[1]) gezeigt hat, gibt Cystin beim Kochen, bei 100°, schon mit einem so schwach alkalischen Mittel wie Magnesiumoxyd einen Teil seines Stickstoffs als Ammionak ab. Wir konnten dies für Cystin durchaus bestätigen, fanden dagegen auch, daß Arginin nicht angegriffen wird. Auf Grund dieser Empfindlichkeit des Cystins muß man das Übertreiben des Ammoniaks bei Zimmertemperatur vornehmen, indem man entweder die Luftmethode von *Denis* oder die Vakuumdestillation benutzt. Nach verschiedenen Versuchen, beide Verfahren zweckmäßig zu modifizieren, haben wir als bequemste und sicherste Methode die folgende angewandt:

Die Lösung des hydrolysierten Eiweißes wird in einen kleinen, doppelhalsigen Destillierkolben gebracht und unter vermindertem Druck

Fig. 232.



konzentriert, bis möglichst alle Salzsäure vertrieben ist. Dann wird der Rückstand mit warmem Wasser aufgenommen und die Lösung in einen Meßkolben von 100 oder 250 cm^3 Inhalt — je nach der Menge des hydrolysierten Eiweißes — gefüllt. Hierauf werden der Lösung Proben entnommen, die ungefähr 0·2 *g* Protein entsprechen und mit diesen Kjeldahlbestimmungen ausgeführt, die als Basis der Berechnung der nachfolgenden Bestimmungen und auch zur Kontrolle der Genauigkeit derselben dienen. Die Summe der einzelnen Bestimmungen soll fast genau gleich 100°/₀ des direkt nach *Kjeldahl* gefundenen Gesamtstickstoffs sein.

Zur Bestimmung des Ammoniaks wird unter Zusatz von Kalk unter vermindertem Druck destilliert. Hierzu sind keine besonderen Apparate erforderlich; man gebraucht nur einen doppelhalsigen Destillierkolben

[1]) *Denis*, Amid. Nitrogen in Proteins. Journ. of Biolog. Chem. 8. 365.

von 1 Liter Inhalt, einen gewöhnlichen Destillierkolben von 1 Liter und einen, der 200 *cm*³ faßt. Die Anordnung der Gefäße ist aus der Fig. 232 ersichtlich. Als Indikator bei der Titration mit $\frac{n}{10}$ Säure benutzt man Alizarinsulfonat. Die Lösung oder ein aliquoter Teil, der ungefähr einer Menge von 3 *g* hydrolysierten Proteins entspricht, wird in den doppelhalsigen Kolben gebracht und auf etwa 200 *cm*³ verdünnt. Dann fügt man 100 *cm*³ Alkohol hinzu, um das Schäumen während des Destillierens zu verhindern, setzt eine 10%ige Calciumhydratsuspension im geringen Überschuß hinzu, der sich durch bleibende Trübung und alkalische Reaktion der Lösung bemerkbar macht, und verbindet hierauf sogleich die einzelnen Teile des Apparates, wie es aus der beigegebenen Abbildung ersichtlich ist. Es wird nun bis zu einem Druck von 30 *mm* oder weniger evakuiert. Dann wird der *Claissen*sche Destillierkolben in ein Wasserbad von 40 bis 50° gebracht und die Lösung eine halbe Stunde lang destilliert. Falls die Destillation zu rasch vor sich gehen sollte, so läßt man etwas Luft durch den Sperrhahn in den Claissenkolben. Ist die Destillation beendet, so wird der Destillierkolben aus dem Wasserbade entfernt, wonach das Vakuum durch Öffnen des Sperrhahns unterbrochen wird. Die $\frac{n}{10}$ Säure des vorgelegten Kolbens und des kleineren Sicherheitskolbens wird jetzt in ein Becherglas oder in einen Erlenmeyerkolben von $^1/_2$ *l* Inhalt gespült und mit $\frac{n}{10}$ NaOH zurücktitriert. Die Menge der $\frac{n}{10}$ Säure in dem größeren Kolben beträgt, falls ein Eiweißkörper tierischer Herkunft vorliegt, gewöhnlich 30 *cm*³, und wenn es sich um ein Protein pflanzlichen Ursprungs handelt, 60 *cm*³, da manche Pflanzeneiweißstoffe mehr Ammoniak als die tierischen Proteine enthalten.

Melaninstickstoff. Während der Destillation werden die gesamten schwarz gefärbten Produkte oder Melanine, die bei der Hydrolyse der Proteine entstehen, durch den ungelösten Kalk adsorbiert. Man filtriert von letzterem mittelst eines Faltenfilters und wäscht mit Wasser, bis das Waschwasser chlorfrei ist. Die ungelöste, rückständige Masse und das Filter werden dann der Kjeldahlbestimmung unterworfen, und zwar benutzt man dabei 35 *cm*³ Schwefelsäure, um die beträchtliche Menge organischer Materie des Filters aufzuschließen. Bei dieser Bestimmung kommt dem Kalk die gleiche Funktion zu wie dem Magnesiumoxyd bei der Aufteilung des Proteinstickstoffs nach *Osborne* und *Harris.*[1])

Das Fällen, Waschen und Wiederlösen der Basen. Das Filtrat des Melanins wird mit Salzsäure neutralisiert, wieder in den Vakuum-Destillierkolben gebracht und darin auf ungefär 100 *cm*³ konzentriert. Dann spült man es in einen 200 *cm*³ Erlenmeyerkolben, fügt 18 *cm*³ konzentrierte Salzsäure und eine 15 *g* Phosphorwolframsäure enthaltende Lösung

[1]) *Osborne* and *Harris,* Journ. Americ. Chem. Soc. 25. 323 (1903).

hinzu. Diese Lösung wird mit Wasser auf 200 cm^3 verdünnt und in einem Wasserbad erhitzt, bis die Basenfällung nahezu oder vollständig wieder aufgelöst ist. Durch Abkühlen werden die Basen in Form von kristallisiertem oder körnigem Phosphorwolframat wieder abgeschieden, das man nun bequem auswaschen und filtrieren kann. Die obigen Fällungsbedingungen sind praktisch diejenigen von *Osborne* und *Harris*, nur mit dem Unterschied, daß man, um den Calciumsulfatniederschlag zu vermeiden, anstatt der Schwefelsäure eine entsprechende Menge Salzsäure benutzt. Die Lösung läßt man zur vollständigen Niederschlagsbildung 48 Stunden lang stehen. In kürzerer Zeit geht die Abscheidung des Histidins nur unvollkommen vor sich.

Fig. 233.



In betreff des Auswaschens ist zu bemerken, daß der Niederschlag gänzlich von der Mutterlauge, welche Aminosäuren enthält, befreit werden muß. Man muß aber darauf bedacht sein, eine möglichst geringe Menge Waschlösung zu benutzen, da sonst der Niederschlag, der in der Lösung wenn auch schwer, so doch meßbar löslich ist, in bemerkenswerter Menge durch das Auswaschen gelöst würde. Um dies zu vermeiden, verfährt man in folgender Weise, wobei man den Niederschlag bereits quantitativ mit 100—200 cm^3 Lösung befriedigend auswaschen kann. Man schneidet sich ein gehärtetes Filter zurecht, das man genau für eine 7·5 *cm* breite Büchner-Nutsche paßt. Das Filter präpariert man sich so, daß es sowohl den Boden als auch die Wandung der Nutsche bedeckt (vgl. Fig. 233). Den an der Wandung anliegenden Teil faltet man in ungefähr 20 kleine Falten. Auf das Filter bringt man nun die Fällung samt Mutterlauge, saugt den Niederschlag möglichst trocken und preßt denselben gut aus. Dann wird das Filtrat aus der Saugflasche in ein Becherglas gegossen. Auf den im Filter befindlichen Niederschlag gießt man 10—12 cm^3 der Waschflüssigkeit, die 2·5% Phosphorwolframsäure und 3·5% Salzsäure enthält; Niederschlag und Lösung werden tüchtig umgerührt, bis sich eine breiartige Masse gebildet hat. Man muß dabei sorgfältig alle Klumpen gut zerteilen, damit der Niederschlag durch und durch zu einer feinen Suspensionsmasse wird. Erst dann wird, wie am Anfang, trocken gesaugt. Das Auswaschen wird in derselben Weise wiederholt, bis das Filtrat frei von Calcium ist, was, je nach der Menge des Niederschlages, nach 8- bis 15maligem Auswaschen erreicht ist. Mit

den ersten 3 oder 4 Portionen Waschflüssigkeit spült man die noch in dem Fällungskolben haften gebliebenen Reste des Niederschlags heraus. Die übrigen Portionen werden sorgfältig mittelst einer Spritzflasche oder einer Pipette in einem feinen Strahl um — bezw. auf — den Rand des Filters gespritzt, so daß der letztere seinem ganzen Umfang nach vom oberen Rand an bis herab ausgewaschen wird. Falls nach den ersten 4 Auswaschungen noch einige Körnchen des Niederschlags im Kolben haften geblieben sind, so läßt man sie einfach darin zurück, da sie bereits genügend ausgewaschen wurden. Die nächsten Mengen der Waschflüssigkeit werden jedenfalls zum Auswaschen des Filterpapiers und des darauf befindlichen Niederschlages in der eben beschriebenen Weise benutzt. Im Falle die Waschflüssigkeit etwas trübe durchgeht, was ziemlich häufig bei den letzten Auswaschungen der Fall ist, so wird das trübe Filtrat, ehe es mit den anderen filtrierten Flüssigkeiten vermischt wird, durch ein kleines Faltenfilter filtriert. Die für die Fällung und für die Bereitung der Waschlösung benutzte Phosphorwolframsäure muß mit Äther und Wasser nach der Methode von *Winterstein*[1]) gereinigt werden.

Um das Waschwasser auf Calcium zu prüfen, benutzt man eine Lösung von Oxalsäure in 3%iger Natronlauge. Zu ungefähr 1 cm^3 dieser Lösung fügt man 2 oder 3 Tropfen des Filtrats, schüttelt gelinde um, bis die obere Schicht (das Filtrat) alkalisch geworden ist. Das Auswaschen wird so lange fortgesetzt, bis eine Probe des Filtrats mit der Oxalatlösung, auch nachdem es einige Minuten gestanden hat, keine Spur einer Fällung in der oberen Schicht ergibt.

Nachdem das Auswaschen beendet worden ist, wird der Niederschlag so vollständig wie möglich mit Hilfe eines Spatels und einer Spritzflasche mit destilliertem Wasser in ein Becherglas von mehr als einem Liter Inhalt gebracht. Nachdem der Niederschlag vom Filter auf mechanische Weise so vollständig wie nur irgend möglich entfernt worden ist, wird das Filterpapier in einer Schale ausgebreitet und mit Wasser, das mit wenigen Tropfen einer 20%igen Kalilauge alkalisch gemacht wurde, ausgewaschen. Hierdurch werden die Anteile des Niederschlages, die in die Fasern des Filtrierpapieres eingedrungen sind, aufgelöst. Das kleine Faltenfilter, das zur Filtration der trüben Anteile der Waschflüssigkeit benutzt worden ist, wird in ähnlicher Weise von anhaftendem Niederschlag befreit. Falls einige Körnchen der Fällung in dem Fällungskolben zurückgeblieben sind, werden diese entweder herausgewaschen oder aufgelöst und zu dem anderen Teil der im großen Becherglas befindlichen Flüssigkeit gebracht. Zu dem Inhalt desselben fügt man einige Tropfen Phenolphthaleinlösung und dann unter Umrühren tropfenweise 50%ige Natronlauge. Sobald die Lösung rot geworden ist, wird mit dem Zusatz von Alkali aufgehört, bis die Färbung wieder verschwunden ist. Der gesamte Niederschlag wird sogleich auf diese Weise in Lösung gebracht. Die Lösung muß zuletzt rot sein; sie darf aber

[1]) *E. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**. 155 (1901/02); l. c.

nicht mehr denn 3 oder 4 Tropfen Alkali im Überschuß enthalten, als zur Neutralisation erforderlich ist. Ein größerer Überschuß an Alkali ist wegen der Empfindlichkeit des Cystins und Arginins gegen Alkali zu vermeiden.

Die Lösung wird auf ungefähr 800 *cm*³ verdünnt und dann eine 20⁰/₀ige Lösung von kristallinischem Bariumchlorid je in Mengen von wenigen Kubikzentimetern hinzugesetzt. Nach jemaligem Zusatz von Bariumchlorid, prüft man einen Tropfen der Lösung mittelst neutraler Natriumsulfatlösung. Das Chlorbarium wird solange zugesetzt, bis die Lösung keine Reaktion auf Baryum mehr gibt. Falls die Lösung ihre rote Färbung während der Fällung verliert, setzt man noch 2 oder 3 Tropfen der Alkalilösung hinzu, denn die Fällung ist nur vollständig, wenn die Lösung schwach alkalisch reagiert. Die Bariumchloridlösung muß solange hinzugesetzt werden, bis eine Probe sofort einen körnigen Niederschlag von Bariumsulfat liefert. — Falls noch nicht genug Bariumchlorid zur vollständigen Fällung des Phosphorwolframates hinzugesetzt ist, so kann auch mit Natriumsulfat eine bemerkenswerte Trübung erhalten werden. Andrerseits ist ein größerer Überschuß von Bariumchloridlösung als wenige Kubikzentimeter zu vermeiden, denn es würde sonst, wenn man die Lösung später zur Argininbestimmung kocht, unangenehme Klumpenbildung stattfinden. Die vor der Fällung vorgenommene Verdünnung ist nötig, um Verluste an Basen durch Adsorption mittels Bariumphosphorwolframats zu vermeiden.

Die Bariumphosphorwolframatfällung wird nun filtriert und mit Wasser gewaschen. Filtration und Auswaschen werden in der für die Phosphorwolframate der Basen bereits beschriebenen Weise ausgeführt, nur mit dem Unterschied, daß hier nicht so kleine Wassermengen zu gebrauchen sind. Es kann hierbei gewöhnlich für beide Filtrationen mit Vorteil dieselbe Nutsche und dasselbe gehärtete Filter benutzt werden.

Das Auswaschen wird solange fortgesetzt, bis die Lösung chloridfrei abläuft. Das Filtrat wird dann im Vakuum konzentriert, und zwar in dem doppelhalsigen Destillierkolben, der früher für die Bestimmung des Amidstickstoffs gebraucht wurde. Man konzentriert, bis das Volumen der Lösung auf 50 *cm*³ reduziert ist. Während des Einengens scheidet sich noch eine geringe Menge Bariumphosphorwolframat aus, das vorher nicht ausgefallen war. Von diesem wird in einen doppelhalsigen Destillierkolben von 200 *cm*³ abfiltriert, das Filter mit Wasser ausgewaschen, bis es chlorfrei ist, die Lösung dann konzentriert und endlich in einen Meßkolben von 50 *cm*³ Inhalt übergeführt.

Bestimmung des Arginins. Die Bestimmung des Arginins beruht auf der zuerst von *Osborne*, *Leavenworth* und *Brautlecht*[1]) angegebenen Tatsache, daß Arginin, wenn es mit verdünnter Alkalilösung gekocht wird, die Hälfte seines Stickstoffs in Form von Ammoniak abgibt. Dieser Reaktionsverlauf findet seine Erklärung darin, daß Arginin beim Erhitzen mit alkalischen Lösungen, wie *Schulze* und *Winterstein*[2]) gezeigt haben, in je 1 Molekül

[1]) *Osborne*, *Leavenworth* and *Brautlecht*. Different forms of Nitrogen in Proteins. Americ. Journ. Physiol. 23. 180 (1908).

[2]) *E. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol Chem. 34. 153; l. c.

Harnstoff und Ornithin zerfällt. Der Harnstoff wird dann zu Ammoniak zersetzt. Die Reaktion verläuft unter den folgenden Bedingungen quantitativ.

Zur ihrer Ausführung werden von den 50 cm^3 der die Basen enthaltenden Lösung 25 cm^3 in einen 200 cm^3 fassenden Jenaer Kjeldahlkolben des aus Fig. 234 ersichtlichen Apparates gebracht. Das obere Ende des Kondensrohres des auf den Kolben anzubringenden Rückflußkühlers ist durch Glasschliff mit dem *Folin*schen Kugelapparat, wie aus der Figur zu ersehen ist, verbunden, oder auch mit einem dicken Stück Gummischlauch, das allerdings weniger geeignet ist, aber doch ebenfalls genügt. In die *Folin*schen Kugeln bringt man 15 cm^3 $\frac{n}{10}$ Säure mit etwas Alizarinsulfonat als Indikator. Zu der im Kolben befindlichen Lösung fügt man 12·5 g festes Kalihydrat und ein kleines Stückchen porösen Porzellans, um Stoßen zu verhindern. Nun wird die Lösung genau 6 Stunden lang gelinde gekocht. Hierauf wird der *Folin*sche Kugelapparat vom Kondensrohr entfernt; durch das letztere gießt man 100 cm^3 Wasser in den Kjeldahlkolben. Die Lösung im Kolben enthält noch eine geringe Menge Ammoniak; der größere Teil ist dagegen während des sechsstündigen Kochens bereits in das Kugelgefäß gelangt und dort von der vorhandenen Säure absorbiert worden. Um auch die geringe noch im Kolben zurückgebliebene Menge Ammoniak zu entfernen, verbindet man den Destillierkolben mit dem Kühler eines gewöhnlichen Kjeldahlapparates und treibt das Ammoniak in der üblichen Weise über. Die Vorlage enthält die Säure aus dem *Folin*schen Kugelapparat, so daß dann sämtlicher aus der Argininbestimmung resultierender Ammoniak in einer $\frac{n}{10}$ Säurelösung gesammelt ist. Während der Destillation darf man nicht mehr als 100 cm^3 Wasser verkochen lassen, da in zu stark konzentrierter alkalischer Lösung außer der gewünschten Zersetzung Nebenzersetzungen vor sich gehen. Der Überschuß der $\frac{n}{10}$ Säure in der Vorlage wird in der gewöhnlichen Weise zurücktitriert. Für die Berechnung ist zu bemerken, daß jeder durch Ammoniak neutralisierte Kubikzentimeter 0·0028 g Argininstickstoff der zersetzten Lösung entspricht oder 0·0056 g der gesamten Lösung der Basen. Falls auch Cystin vorhanden ist, werden 17% seines Stickstoffs als Ammoniak während der Argininbestimmung entwickelt; es muß also dann eine entsprechende Korrektur in bezug auf die Argininwerte angebracht werden. Die Korrektur ist jedoch bei den meisten gewöhnlichen Proteinen, die Keratine ausgenommen, zu ver-

Fig. 234.

N/10 Säure

nachlässigen. Da sich das Cystin unter den Bedingungen der Bestimmung ganz konstant verhält, wird die Genauigkeit der Argininbestimmung auch bei den Keratinanalysen nicht wesentlich beeinflußt. Die Cystinbestimmung, bei welcher die Korrektur genau ausgeführt werden kann, findet sich weiter unten beschrieben.

Der 200 *cm*³-Kjeldahlkolben sollte nicht für mehr als für 2 oder 3 Argininbestimmungen benutzt werden, da das Glas durch das starke Alkali angegriffen wird. Leider sind Kupferkolben bei der Bestimmung nicht gebrauchsfähig.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs der Basen. Die für die Argininbestimmung gebrauchte Lösung wird aus dem 200 *cm*³-Kjeldahlkolben in einen Kolben von 500 *cm*³ Inhalt gebracht. Dann setzt man 35 *cm*³ konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig unter Abkühlung und 0·25 *g* Kupfersulfat hinzu. Die Lösung wird nun wie bei einer gewöhnlichen Kjeldahlbestimmung behandelt und so der Stickstoffgehalt bestimmt. Die hierbei durch $\frac{n}{10}$ Säure neutralisierten Kubikzentimeter werden zu den bei der Argininbestimmung verbrauchten addiert. Diese Summe, multipliziert mit 0·0028, liefert in Grammen den Totalstickstoffgehalt der Basen. Der Gebrauch derselben Portion, sowohl für die Arginin- als auch für die Gesamtstickstoffbestimmung der Basen, erlaubt also für beide Bestimmungen je die ganze Hälfte der vorhandenen Lösung zu verwenden und gibt infolgedessen auch genauere Resultate, als wenn man die Lösung wieder aufteilen und jede Bestimmung in einem besonderen, kleineren Teil ausführen würde.

Bestimmung des Cystins. Die Menge des in dem Basengemisch vorhandenen Cystins wird durch Bestimmung des organischen Schwefels der Lösung festgestellt. Für diese Bestimmung ist das bequemste und genaueste Verfahren das von *Benedict*, das sich auf Oxydation durch Verbrennung mit Kupfernitrat gründet.[1] Wir haben uns der von *Denis*[2] vorgeschlagenen Modifikation bedient. Die Oxydation ist dabei durchaus vollständig; keine Spur Kohle oder irgend einer unlöslichen Masse bleibt zurück. Wir fanden, daß man die Schwefelbestimmung unbesorgt mit der Basenlösung vornehmen kann, ohne vorher das vorhandene Bariumchlorid zu entfernen. Zur Bestimmung bringt man 10 *cm*³ der Lösung mit 5 *cm*³ *Denis*scher Flüssigkeit in eine Porzellanabdampfschale von 7—10 *cm* Durchmesser, verdampft die Mischung auf dem Wasserbade zur Trockne, erhitzt nach und nach bis zur Rotglut und erhält 10 Minuten lang bei dieser Temperatur, wie es von *Benedict* vorgeschrieben wurde. Der Rückstand wird dann in 10 *cm*³ 10%iger Salzsäure gelöst und diese Lösung auf ungefähr

[1]) *Stanley R. Benedict*, The Estimation of Total Sulphur in Urine. Journ. of Biol. Chem. 6. 363 (1909).

[2]) *W. Denis*, The Determination of Total Sulphur in Urine. Journ. of Biol. Chem. 8. 401 (1910/11). Die *Denis*sche Lösung enthält 25 *g* kristallinisches Kupfernitrat, 10 *g* Ammoniumnitrat und 20 *g* Natriumchlorid auf 100 *cm*³.

150 cm^3 verdünnt. Nun wird zum Sieden erhitzt und, damit sicher ein Überschuß an Bariumchlorid vorhanden ist, werden noch 10 cm^3 einer 5%igen Chlorbariumlösung zugefügt. Das Bariumsulfat wird gewaschen und wie gewöhnlich gewogen. Jedes Milligramm Bariumsulfat entspricht 0·06 *mg* Cystinstickstoff in der untersuchten Lösung oder 0·3 *mg* in der gesamten Basenlösung. Für das Gewicht des erhaltenen Bariumsulfates muß noch eine Korrektur angebracht werden, welche die Menge Schwefel, die bei einer entsprechenden blinden Analyse gefunden wird, berücksichtigt. Für die Reagenzien, die von uns gebraucht wurden, betrug die Korrektur 1·5 *mg* Bariumsulfat. Solche Reagenzien, die eine bedeutend größere Korrektur erfordern, sollten nicht benutzt werden, denn das Cystin ist häufig in so geringen Mengen vorhanden, daß es überhaupt nur wenige Milligramme Bariumsulfat liefert.

Das in der Basenlösung wirklich vorhandene Cystin[1]) kann nach der obigen Methode sehr genau bestimmt werden, denn eine Differenz von 0·5 *mg* für das gewogene Bariumsulfat, wie sie für gewöhnlich bei Doppelbestimmungen nicht höher resultiert, verursacht für den gesamten Prozentgehalt des berechneten Cystinstickstoffs nur einen Fehler von 0·1%. Das ursprünglich vorhandene Cystin wird durch die Hydrolyse mit Säuren nach und nach angegriffen und in eine nicht durch Phosphorwolframsäure fällbare Form übergeführt; während 16stündigen Kochens mit 20%iger Salzsäure werden 41% des Cystins in dieser Weise verändert und während 24stündigen Kochens 50%. Ferner bleibt bei der Basenfällung eine Menge unangegriffenen Cystins, das ½% des Eiweißstickstoffs ausmacht, in Lösung. Infolgedessen repräsentiert die Menge Cystin, die durch die obige Methode nach der Hydrolyse durch 24stündiges oder längeres Kochen erhalten wird, weniger als die Hälfte des wirklich in dem betreffenden Eiweiß vorhandenen. Der Niederschlag des Basengemisches enthält, da die Eiweißkörper für gewöhnlich nicht reich an Cystin sind, deshalb auch nur eine kleine Menge seines Stickstoffs oder überhaupt keinen in Form von Cystin. Dies erklärt auch, warum die Anwesenheit von Cystin in den Phosphorwolframat-Niederschlägen meistens übersehen worden ist, ehe von *Winterstein*[2]) auf diese Tatsache aufmerksam gemacht wurde.

Aminostickstoff der Basen. Für diese Bestimmung, die in der gewöhnlichen Weise ausgeführt wird, benutzt man 10 cm^3 der Lösung. Da die ε-Aminogruppe des Lysins verhältnismäßig langsam reagiert, muß die Bestimmung bei 20° eine halbe Stunde lang oder, wenn die Temperatur niedriger ist, während etwas längerer Zeit ausgeführt werden. Während ebenso langer Zeit muß auch die blinde Bestimmung mit den Reagentien

[1]) *Mörner* fand, daß Cystin durch 109stündiges Kochen mit 10%iger Salzsäure seine spezifische Drehung von —223° auf —134° vermindert, und daß es sich dabei zum Teil in eine augenscheinlich löslichere Form als das natürliche Cystin darstellt, verwandelt. — *K. A. H. Mörner*, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**. 207 (1901/02).

[2]) loc. cit.

vorgenommen werden. Das Cystin liefert an Gas 107% der Stickstoffmenge, die es eigentlich geben sollte. Man muß deshalb für das Cystin eine entsprechende Korrektur bei den Aminobestimmungen anbringen. Sie kann jedoch bei den Eiweißkörpern, die keine Keratine sind, vernachlässigt werden.

Berechnung des Histidins. Der Nicht-Aminostickstoff der Basen stammt aus dem Arginin, das $^3/_4$ seines Stickstoffs in einer Form enthält, die nicht mit salpetriger Säure reagiert, und aus dem Histidin, das $^2/_3$ seines Stickstoffs in Nicht-Aminoform besitzt. Deshalb muß man zur Berechnung des Histidin-Stickstoffs $^3/_4$ des Argininstickstoffs von dem Total-Nichtaminostickstoff abziehen und die Differenz mit $^3/_2$ multiplizieren.

Die Berechnung kann, wie folgt, ausgeführt werden: Bezeichnet man mit D den gesamten Nicht-Aminostickstoff der Basen (Unterschied zwischen Totalstickstoff und Aminostickstoff) und mit Arg den Argininstickstoff, der, wie vorher beschrieben, bestimmt wurde, so hat man folgende Formel aufzustellen:

$$\text{Histidin-N} = \frac{3}{2}\left(D - \frac{3}{4} Arg\right) = 1{\cdot}667\, D - 1{\cdot}125\, Arg.$$

Die Bestimmung des Histidins kann mehr als jede der anderen 3 Aminosäuren der basischen Fraktion fehlerhaft sein, da sie durch Fehler entweder in der Bestimmung des Arginins, des Totalstickstoffs oder des Aminostickstoffs beeinflußt werden kann. Fehler von + 1% bei diesen einzelnen Bestimmungen würden Fehler von — 1·125, + 1·5, und — 1·5% für den Histidinstickstoff verursachen. Da aber jene Bestimmungen genau ausgeführt werden können, so kann man für das Histidin doch konstante Resultate erhalten. Tatsächlich stimmen Doppelbestimmungen für das Histidin gewöhnlich innerhalb 1% überein.

Berechnung des Lysins. Das Lysin wird durch Differenzrechnung unter Heranziehung des für die anderen 3 Aminosäuren berechneten Stickstoffgehaltes bestimmt. Oder:

Lysin-N = Total-N — (Arginin-N + Cystin-N + Histidin-N).

Auf den ersten Blick sollte es scheinen, daß die Bestimmung des Lysins mehr als die des Histidins Ungenauigkeiten in sich schließen würde, da bei der fraglichen Berechnung die Resultate der 3 anderen Aminosäuren dieser Fraktion in Betracht kommen. Dies trifft jedoch nicht zu. Die Genauigkeit des Lysinresultates hängt hauptsächlich von den Bestimmungen des Cystins und des Aminostickstoffs dieser Fraktion ab, die beide sehr genau durchgeführt werden können.

Ein Fehler von + 1% bei irgend einer der 4 unmittelbaren, mit dem Basengemisch vorgenommenen Bestimmungen würde für den Lysinstickstoff in folgender Weise zum Ausdruck kommen: Handelt es sich um Amino-N, so würde dies für den Lysinstickstoff + 1·5% verursachen, bei dem Cystin-N würde — 1%, bei dem Total-N müßte — $^1/_2$% und bei dem Arginin-N + $^1/_8$% für den Stickstoff des Lysins in Rechnung zu stellen sein.

Bestimmung des Totalstickstoffs im Filtrate der Basen. Zu dem mit der Waschflüssigkeit vereinigten Filtrate des Basen-Phosphor-

wolframatniederschlages fügt man 50%ige Natronlauge, bis die Lösung durch Kalkabscheidung schwach trübe wird. Dann wird wieder durch Zusatz von wenig Essigsäure geklärt. Was den Zusatz des Alkalis betrifft, so ist es sehr wichtig, daß der Neutralpunkt höchstens durch einen Überschuß von wenigen Tropfen überschritten wird, da sich sonst durch die Säurewirkung ein unlöslicher Niederschlag bilden kann. Die Lösung wird nun in einen doppelhalsigen Destillierkolben gebracht und unter vermindertem Druck eingeengt, bis das Salz eben auszukristallisieren beginnt. Dann spült man in einen 150 *cm*³-Meßkolben, verdünnt bis zur Marke und entnimmt für zwei Kjeldahlbestimmungen je 25 *cm*³. Für jede dieser Bestimmungen verwendet man 15 *g* Kaliumsulfat, 35 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure und 0·25 *g* Kupfersulfat. Die Schwefelsäure muß, wegen der heftig stattfindenden Entwicklung von Salzsäuregas, vorsichtig unter einer Kappe hinzugesetzt werden. Die Zersetzung muß man noch 3 Stunden lang, nachdem die Lösung bereits klar geworden ist, fortsetzen. Unter diesen Bedingungen beeinträchtigt die Phosphorwolframsäure keinesfalls die Genauigkeit der Bestimmung.

Bestimmung des Aminostickstoffs im Filtrate der Basen. Für die Aminobestimmungen benutzt man Portionen des Filtrats von je 10 *cm*³ und nimmt die Ausführung, wie gewöhnlich, während 6—10 Minuten vor. Das Volumen des von einer bestimmten Menge Aminostickstoffs abgegebenen Stickstoffs ist 2·5mal so groß als das Volumen, das der neutralisierten $\frac{n}{10}$-Säure entspricht, die sich bei einer Kjeldahlbestimmung bei der gleichen Menge ergibt. Deshalb werden die Mengen (25 und 10 *cm*³), welche für die Bestimmungen des gesamten und des Aminostickstoffs genommen werden, Resultate von ähnlicher Genauigkeit geben. Da gewöhnlich 25—35 *cm*³ Gas oder Säure mit einem Fehler, der 0·2 *cm*³ nicht überschreitet, gemessen werden, so ist der prozentuale Fehler bei diesen Bestimmungen nur sehr gering.

Reinheit der Reagenzien. Da einige der Berechnungen auf Unterschiede der einzelnen Bestimmungen beruhen, ist es unbedingt erforderlich, daß die letzteren genau sind. Man muß daher auch jedes Reagens, das entweder für die Kjeldahl- oder für die Aminobestimmung gebraucht wird, durch blinde Analysen prüfen; falls dabei irgend eine Spur Stickstoff gefunden wird, so muß eine entsprechende Korrektur angebracht werden. Eine geringfügige Korrektur ist für gewöhnlich nötig, sowohl für das käufliche Alkali, das beim Übertreiben des Ammoniaks bei den Kjeldahlbestimmungen gebraucht wird, als auch für das bei den Aminobestimmungen erforderliche Natriumnitrit. Die Genauigkeit der Normallösungen und die Zuverlässigkeit des Apparates sollte ebenfalls durch Bestimmungen mit reinen Substanzen ausgeprüft werden. Natürlich ist es auch wichtig, daß Pipetten, Meßkolben und Büretten genau kalibriert sind. Die zu verwendende Phosphorwolframsäure wird mit Äther und Wasser nach der Methode von *Winterstein* gereinigt.

Korrektur für die Löslichkeit der Basen. Die infolge der Löslichkeit der Basen erforderliche Korrektur kann direkt nach den unten gemachten Angaben (vgl. Tabelle II) vorgenommen werden, wenn die Fällung in der vorgeschriebenen Weise in einer Lösung von 200 cm^3 Volumen ausgeführt wurde. Wenn auch die Konzentration der in Lösung bleibenden Phosphorwolframsäure bei der Fällung der Basen etwas abhängig ist von der Menge der letzteren, so daß die Fällungsbedingungen nicht absolut konstante sind, so scheinen diese Unterschiede jedoch nicht bedeutend genug zu sein, um eine bemerkenswerte Änderung in der Löslichkeit der Basen hervorzurufen. Werden die Basen in Lösungen von einem größeren oder geringeren Volumen als 200 cm^3 gefällt, so steht die Löslichkeitskorrektur natürlich im direkten Verhältnis zum Volumen der Lösung. Die Menge Stickstoff, die von dem Niederschlag durch das in der früher beschriebenen Weise vorgenommene Auswaschen weggelöst wird, ist, nach Kontrollbestimmungen zu urteilen, nicht der Beachtung wert.

Tabelle II.

Löslichkeitswerte der Basen bei Fällung aus einer Lösung von 200 cm^3.
Zu den einzelnen Basenmengen ist hinzuzufügen:

	Total N	Amino N	Nichtamino N
Arginin N	0·0032	0·0008	0·0024
Histidin N	0·0038	0·0013	0·0025
Lysin N	0·0005	0·0005	0·0000
Cystin N	0·0026	0·0026	0·0000
Summe (abzuziehen von den Filtrat-Resultaten)		0·0052	0·0049

Genauigkeitsgrenzen der Bestimmungen. Die maximalen und mittleren Unterschiede, welche Doppelanalysen bei Gliadin, Edestin, Haaren, Gelatine, Fibrin und Hämocyanin ergeben haben, sind, in Prozentgehalt des Totalstickstoffs der Proteine ausgedrückt, aus folgender Zusammenstellung ersichtlich:

Tabelle III.

	Maximaler Unterschied zwischen Doppelbestimmungen	Durchschnittsdifferenz
Ammoniak N	0·37	0·12
Melanin N	0·56	0·20
Cystin N	0·11	0·05
Arginin N	1·27	0·73
Histidin N	2·14 (0·93)	0·79
Lysin N	1·23	0·61
Amino N im Filtrate der Basen	1·60 (0·60)	0·63
Nichtamino N im Filtrat	1·20	0·68

Die höchsten Unterschiede für Histidin (bei Edestin-Analysen) und für Aminostickstoff des Filtrates (bei Haaranalysen) sind etwa zweimal so groß als irgend eine andere, bei den obigen Analysen gefundene Abweichung. Die nächst niederen Werte, die in Klammern gesetzt sind, belaufen sich auf Unterschiede, die bei Doppelbestimmungen normalerweise zu erwarten sind.

Als Beispiele für Analysenresultate von Eiweißkörpern seien die Ergebnisse von den unten angegebenen 7 Eiweißstoffen angeführt. (Tabelle IV.) Die Menge des im Gliadin gefundenen Lysins ist so gering, daß sie noch innerhalb der Fehlergrenze liegt. Das negative Resultat an Cystin bei Gelatine und Hämoglobin besagt, daß durch die Phosphorwolframsäure nichts davon niedergeschlagen worden ist; im Filtrat könnte doch 0·5% in unveränderter Form vorhanden sein. Bei den Resultaten sind die für die Löslichkeiten der Basen erforderlichen Korrekturen angebracht: alle Werte, mit Ausnahme derjenigen beim Hämoglobin, sind Durchschnittszahlen von Doppelbestimmungen. Die einzelnen Resultate drücken aus, wieviel Prozent Stickstoff in den betreffenden Aminosäuren oder Gruppen in den Proteinen, bezogen auf den Totalstickstoff, vorhanden sind.

Tabelle IV.

	Gliadin (Weizen)	Edestin (Hanf)	Haar (Hund)	Gelatine	Fibrin (Merck)	Hämocyanin (Limulus)	Hämoglobin (Rind)
Ammoniak N . . .	25·52	9·99	10·05	2·25	8·32	5·95	5·24
Melanin N	0·86	1·98	7·42	0·07	3·17	1·65	3·6
Cystin N	1·25	1·49	6·60	0·00	0·99	0·80	0·0
Arginin N	5·71	27·05	15·33	14·70	13·86	15·75	7·7
Histidin N	5·20	5·75	3·48	4·48	4·83	13·23	12·7
Lysin N	0·75	3·86	5·37	6·32	11·51	8·49	10·9
Amino-N des Filtrats	51·98	47.55	47·5	56·3	54·2	51·3	57·0
Nichtamino-N des Filtrats (Prolin, Oxyprolin, 1/2 Tryptophan)	8·50	1·7	3·1	14·9	2·7	3·8	2·9
Summe:	99·77	99·37	98·85	99·02	99·58	100·95	(100·0)

Um aus den obigen Zahlen der Stickstoffprozente zu berechnen, wieviel Gramm Aminosäure auf 100 *g* Protein entfallen, können die folgenden mittleren Faktoren herangezogen werden, die sich ergeben, wenn man für jedes Protein 17% Stickstoff annimmt. Der Stickstoffwert für Arginin wird mit 0·528 multipliziert, derjenige für Histidin mit 0·626, der für das Lysin mit 0·886 und der des Cystins mit 1·46.

Die Zuntzsche Methode der Gasanalyse.

Von **Franz Müller**, Berlin.

In Band III, Abt. I, dieses Handbuchs (S. 610) ist auf die Bestimmung der Kohlensäure nach dem Thermobarometerprinzip hingewiesen worden. Eine genauere Beschreibung des Prinzips war auf S. 575 gegeben, die des Apparates von *Zuntz* unterblieb dagegen, da sie in einem späteren Abschnitt des Handbuchs bei der Besprechung der Methodik des Energiestoffwechsels erfolgen sollte. Auf S. 1156 (Band III, Abt. 2) ist zwar der von *Zuntz* angegebene Analysenapparat skizzenhaft wiedergegeben (Fig. 323), aber die Analyse selbst nicht eingehender beschrieben worden. Das soll im Folgenden kurz nachgeholt werden.

Das von *N. Zuntz* ausgearbeitete gasanalytische Verfahren ist eine Modifikation der *Hempel*schen Anordnung.[1])

Der Analysenapparat (s. Fig. 235)[2]) besteht aus mehreren Gasbüretten, in denen die Messung der Gasvolumina und 4 Pipetten, in denen die Absorption der Kohlensäure und des Sauerstoffes stattfindet.[3]) Die ersteren, 7 an der Zahl, stehen in einer mit Spiegelscheiben versehenen, mit Wasser gefüllten Wanne. Die mittlere Bürette dient als thermobarometrischer Kontrollapparat, die übrigen 6 bilden, zu je dreien symmetrisch angebracht, zwei gleiche Gruppen zur gleichzeitigen Anstellung von 2 Analysen. In den 2 seitlich am weitesten nach außen stehenden, die von 99·6—101·0 cm^3

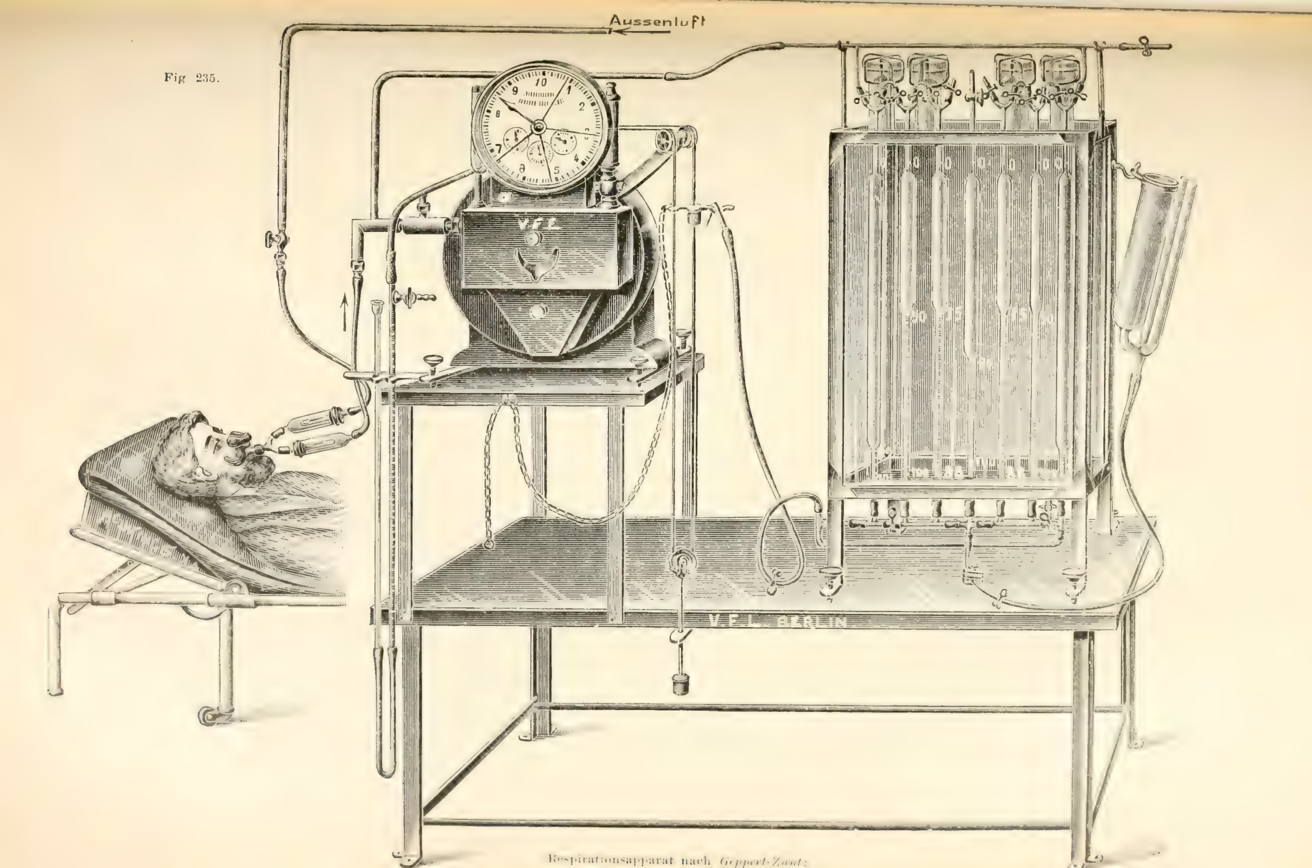
---

[1]) In der Arbeit von *A. Loewy* (Pfl. Arch. 42, S. 267, 1888) ist die Methodik noch fast gleich der *Hempel*schen: *Hempel*sche Bürette und Absorptionspipette für Kohlensäure. In der Arbeit von *Katzenstein* (Pfl. Arch. 49, S. 335) finden wir schon das sog. Thermobarometer nach *N. Zuntz*' Angaben, aber in der Form, daß ein unten geschlossenes Glasrohr von demselben Kaliber wie die Hempelbürette oben mit einem im rechten Winkel stehenden engen, feingeteilten Rohr von 1 cm^3 Inhalt in Verbindung steht. In diesem befindet sich ein gefärbter Wassertropfen, der bei Wechsel von Temperatur und Druck in dem Röhrchen wandert. Die endgiltige Form findet sich bei *Ad. Magnus Levy* (Pfl. Arch. 55, S. 14 ff. und Tafel I, 1894).

[2]) Der Apparat kann von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N., fertig bezogen werden.

[3]) Die auf Fig. 235 dargestellte, sehr zweckmäßige Form der Absorptionspipetten wurde von *J. Paechtner* angegeben. (Inaug.-Diss. Gießen. Verlag *R. Schoetz*-Berlin. 1909. Fig. 1 u. 1*a*.)

Fig 235.



Respirationsapparat nach *Geppert-Zuntz*.

in Zwanzigstel geteilt sind und ebenso wie die anderen 5 an der oberen kapillaren Verjüngung nahe der Erweiterung ihre Nullmarke tragen, werden die zu untersuchenden Parallelproben eines Kohlensäure, Sauerstoff und Stickstoff (und eventuell brennbare Gase) enthaltenden Gemisches durch allmähliches Herabsinkenlassen des sie erfüllenden Wassers aufgesammelt. Dies geschieht durch vorsichtiges Öffnen der Klemmschraube unten am Schlauch zum Niveaurohr. Das Wasser muß so langsam sinken, daß keine Tropfen an der Wand hängen bleiben (etwa 20 Minuten). Darauf läßt man die 100 cm^3 Gas einige Minuten stehen und liest unter Einstellung des Niveaurohres in Augenhöhe (s. Bd. III, S. 575) sowohl in den zwei seitlichen Röhren, wie im mittleren Thermobarometerrohr den Stand ab. Bei kohlensäurereicheren Gemischen (über 0·5) darf das Gemisch vor der Ablesung nicht länger als etwa 10 Minuten in den Büretten stehen. Das gemessene Volumen wird dann in die 2 äußeren Pipetten eingeführt, indem das alle Röhren erfüllende, deutlich schwefelsaure Wasser, welches mit einem Tropfen Rosolsäure gelb gefärbt ist, durch Heben des Niveaurohres gerade bis an die obere Nullmarke (in Niveaustellung) herangeführt wird. Diese zwei Pipetten sind mit etwa 40%iger wässeriger Kalilauge gefüllt. Kohlensäurearme Gemische bis zu etwa 0·5% werden darin nach einer Minute kohlensäurefrei, solche mit mehreren Prozent Kohlensäure nach etwa 5 Minuten. Die Absorptionsfläche ist durch eine große Reihe von in der inneren Glocke befindlichen Glasröhren vergrößert. Die Einstellung der Kalilauge in den die Pipetten mit den Büretten verbindenden Kapillarrohren war so, daß die Lauge gerade die Hälfte des horizontalen Teils des Kapillarrohrs, das dann nach unten abbiegt, erfüllte. Nachdem man den zum Niveaurohr führenden Schlauch wieder durch die Schraubklemme verschlossen hat, öffnet man die Verbindungen zwischen den Kalilaugepipetten und dem zweiten Röhrenpaar. Bei tiefhängendem Niveaurohr und ganz wenig geöffneter Klemmschraube läßt man das Wasser in den Büretten wieder so langsam absinken, daß sich an der Wand keine Tropfenbildung zeigt. Sobald der weite Teil mit Gas erfüllt ist, schließt man die oberen Verbindungen zu den Kalipipetten ab, öffnet die untere Klemmschraube an dem langen Schlauch und reguliert, mit der einen Hand das Niveaurohr senkend, mit der anderen einen oberen Quetschhahn öffnend, das Eintreten des Gases in den engen Teil der einen Bürette, bis die Lauge wiederum mitten in dem horizontalen Kapillarstück oben über den Pipetten erscheint. Darauf schließt man den Quetschhahn und macht dasselbe auf der anderen Seite.[1])

[1]) Die Bürettenröhren dürfen keine größeren Kaliberfehler als 0·05—0·06 cm^3 im ganzen besitzen, da sonst nach Auffangen einer 100 cm^3 etwas übersteigenden Gasmenge eine kohlensäurearme, durch die Kalilaugenpipetten gegangene Luft in den nur zwischen 90·0—100·00 (nicht tiefer!) geteilten zweiten Röhren die unterste Marke überschreiten kann, zumal wenn diese zweiten Röhren selbst einen größeren (negativen) Kaliberfehler haben. Die Büretten werden alle vor dem Gebrauch durch Auswägen mit Wasser (20 Minuten-Ablauf) nachgeaicht und der Fehler in einer stets bereitliegenden Tabelle verzeichnet (s. Berechnung Bd. III, S. 576).

Nachdem das kohlensäurefreie Gemisch abgelesen, wird es unter Heben des Niveaurohres in die inneren zwei Pipetten unter Lüftung der die Verbindung absperrenden Quetschhähne eingefüllt. Wiederum muß das saure Wasser gerade an der Nullmarke am oberen Ende der Büretten stehen. Dieses zweite Pipettenpaar aus braunem Glas enthält dünne, etwa 3 *mm* dicke Phosphorstangen, die zum Teil bis oben heran in die Verengerung der inneren Glocke reichen. Sie stehen in destilliertem Wasser. Wie in Band III, S. 626, erörtert (dort siehe auch die Herstellung der Phosphorstangen), verläuft die Sauerstoffabsorption über 12—14° C und bei einem Sauerstoffgehalt bis 50% sicher in 10 Minuten, solange die Phosphorstangen noch nicht mit brauner Schicht bedeckt sind. Unter 14° dauert sie dagegen etwa eine halbe Stunde, unter 10° ist sie nicht mehr ausführbar. Man muß dann die Pipetten mit einem heizbaren Außenmantel, in dem Wasser auf 25° erwärmt wird, umgeben.

Nach beendeter O_2-Absorption wird das Restgas nach vorherigem Abklemmen des unteren Schlauches zum Niveaurohr und Öffnen der oberen Quetschhähne, durch vorsichtiges Öffnen der unteren Schraube ganz langsam in die dritte Gruppe von Büretten eingelassen. Diese sind von 75 bis 85 *cm*³ in Zwanzigstel geteilt, da zwischen 78 und 81 *cm*³ Gasrest bei Luft oder Atemgas zurückbleiben. Nachdem das Gas den weiten Teil der Rohre erfüllt hat, schließt man die oberen Quetschhähne, öffnet die untere Schraube und führt den Rest, wiederum unter Leitung des Niveaurohres mit der Hand, in den engen Teil der Büretten über, bis das Wasser aus den Phosphorpipetten in der Mitte des horizontalen kapillaren Glasrohres über den Pipetten erscheint.

Die kapillaren Verbindungsstücke sind immer mit Resten der vorigen Analyse gefüllt. Das macht bei geringen Abweichungen und dem engen Kaliber der Kapillaren keine Fehler. Sie werden dagegen deutlich, wenn luft- und sauerstoffreiche Gemische abwechselnd analysiert werden. Dann muß eine Analyse ohne Ablesung durch das ganze System geführt werden, bevor die erste brauchbare Bestimmung beginnt.

Wenn sauerstoffreichere Gemische (über 25%) nach dieser Methode untersucht werden sollen und Phosphor zur Absorption benutzt wird, so muß die Mischung zuvor mit Stickstoff verdünnt werden. Nach Vorgang von *Durig* absorbiert man zunächst den größten Teil des Sauerstoffs durch Kupferlösung.[1]) Zu diesem Zweck stellt man von dem aus den Kalilaugepipetten herabreichenden Kapillarrohr, bevor es das zweite Bürettenpaar erreicht, eine kapillare Abzweigung nach hinten her. Dies Kapillarrohr gabelt sich dann rechtwinklig bei horizontaler Lage. Der eine Schenkel führt zu einer mit ammoniakalischer Kupferlösung und Kupfernetzen gefüllten Pipette (auf der Kupferlösung schwimmt zum Abschluß gegen Luft

[1]) *Durig* empfiehlt auch Natriumhydrosulfit (s. Bd. III, S. 628). In Bd. III ist ebenso wie im Inhaltsverzeichnis des Bandes versehentlich Natriumthiosulfat an Stelle von **Natriumhydrosulphit** mehrfach bei der Korrektur stehen geblieben, während die Formeln richtig sind.

Paraffinum liquidum), der andere zu einer mit starker Schwefelsäure gefüllten Pipette. Das von Kohlensäure befreite Gemisch wird durch Heben des Niveaurohres zunächst in die Kupferlösung gebracht (etwa 10 Minuten), darauf wieder in die gleichen Büretten zurück, dann in Schwefelsäure, um es vollkommen von jeder Spur von Ammoniakdampf zu befreien, da sonst die Phosphorabsorption unmöglich wird, zum drittenmal in die gleichen Büretten und zuletzt erst in die Phosphorpipetten. Wenn der verbleibende Stickstoffrest klein ist und selbst die obersten Spitzen der Phosphorstangen nicht erreicht, also nicht von den letzten Resten von Sauerstoff befreit werden kann, empfiehlt es sich, in dem dritten Bürettenpaar einen Rest von Stickstoff von der vorigen Analyse aufzubewahren, abzulesen und nach dem soeben gewonnenen Rest in die Phosphorpipetten hineinzuleiten. Dadurch wird Kontakt mit den Phosphorstangen ermöglicht.

Bei Gemischen mit weniger als 75% und mehr als 10% Stickstoff kann man natürlich nicht die in der Fig. 235 abgebildete Form der Stickstoffbüretten beibehalten. Man muß vielmehr Büretten wählen, die nach dem kapillaren Anfangsstück eine oder mehrere Erweiterungen von je etwa 10 *cm*³ Inhalt haben und dann in der ganzen Länge bis herunter an den Rand der Wanne geteilt sind. Ihr Gesamtinhalt soll etwa 30—40 *cm*³ betragen. So ist man in der Lage, Gemische mit etwas über 10—40% Stickstoff zu bestimmen. Hat man stickstoffärmere (unter 10%), so bleibt die kuglige Erweiterung mit einem Stickstoffrest der vorigen Analyse erfüllt und man füllt zu dieser gemessenen Menge den kleinen Rest der neuen Analyse hinzu (s. folg. Beispiel), oder man benutzt die abgebildete Röhrenform und einen Rest von 75 *cm*³ N.

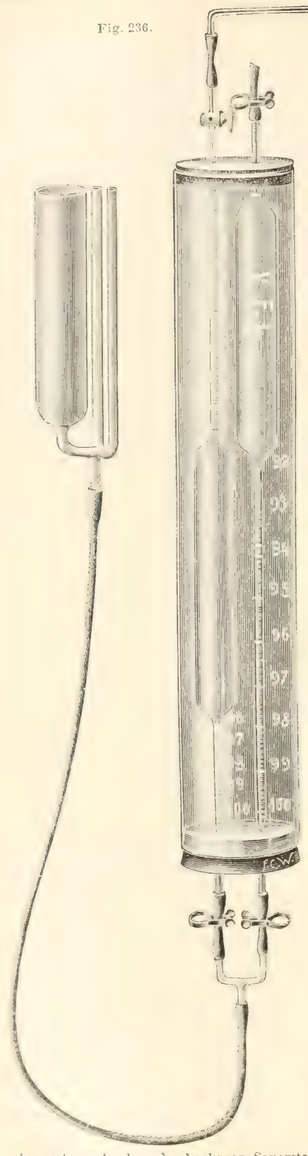
Wünscht man den Apparat sowohl für Luft- wie für Ausatmungsgas und sauerstoffreiche Gemische zu benutzen, so muß das erwähnte enge Stickstoffrohr zwischen den aus den Phosphorpipetten austretenden Kapillarröhren und den zu den großen Stickstoffbüretten leitenden Kapillaren angeordnet werden. Die großen Stickstoffbüretten werden dann durch Abklemmen unten außer Betrieb gesetzt.[1])

Die Analysenwanne ist mit stubenwarmem Wasser gefüllt, das mit Hilfe eines Doppelgebläses stets vor jeder Ablesung gut durchmischt wird. Um gute Resultate zu erhalten, ist es unbedingt erforderlich, daß die aus der Wanne herausragenden, mit Gas gefüllten Glasteile einen sehr geringen Inhalt besitzen (Kapillaren von ½ *mm* lichter Weite) und daß die Temperatur des Raumes während des Verlaufs einer Analyse nicht stark wechselt.

Die gröbsten Fehler, beim Anfänger regelmäßig, entstehen durch **zu schnelles Herablassen** des sauren Wassers bei Aufsammeln der einzelnen

[1]) Eine andere Form zur Analyse von hochprozentigem Sauerstoffbombengas zeigt Fig. 236. Die oben genannten Modifikationen wurden für das Tierphysiologische Institut der landwirtschaftlichen Hochschule und den Referenten von *C. Bleckmann* und *Burger*, Berlin N., Auguststraße 3a, hergestellt.

Fig. 236.



Apparat zur Analyse des hochproz. Sauerstoffs.

Gasproben. Aber selbst wenn man die Büretten im Laufe von 15—20 Min. sich hat mit Gas erfüllen lassen, soll man vor der Ablesung immer noch einige Minuten warten, bis das Wasser an der Wandung der engen Rohrteile vollkommen herabgeflossen ist; eine Vorsicht, die bei der Analyse stickstoffarmer Gemische im Stickstoffrohr ganz besonders zu beachten ist. Die Ablesung, d. h. die Messung, geschieht mit Hilfe des Niveaurohres nach den im Band III, S. 575 gegebenen Prinzipien. Dabei darf man sich nicht wundern, wenn verschiedene Beobachter um 0·01—0·02 differierende Zahlen ablesen. Doch muß die Abweichung regelmäßig eintreten und für Bürette und Thermobarometer im gleichen Sinne verlaufen. Ist dies nicht der Fall, so ist entweder die Ablesung falsch oder noch nicht vollkommener Temperaturausgleich erreicht.

Von mehreren Seiten ist an Stelle der die einzelnen Abteilungen des Apparats trennenden Schläuche mit Quetschhähnen die Verwendung von Glashähnen empfohlen worden. Wir können zur Verwendung von Glashähnen nicht raten, dagegen verwenden wir nur noch, um die Schläuche zu schonen, Stellquetschhähne. Ist der Apparat außer Gebrauch, so wird die Klemmschraube unten am Niveaurohr geschlossen und die oberen Schlauchverbindungen durch Öffnen der Stellquetschhähne geöffnet. So schont man die Gummiverbindungen außerordentlich und kann bei Verwendung von gutem roten Gummi (1 *mm* lichte Weite und 2 *mm* Wandstärke) den Apparat jahrelang, ohne Erneuerung der Schläuche, benützen.

Undichtigkeiten in den Schläuchen treten am leichtesten an den Stellen auf, in die Kalilauge gelangen kann. Das muß man möglichst vermeiden, und

wenn es einmal passiert, mit saurem Wasser gut auswaschen. Auch klemme man die Schläuche nicht dicht am Glas ab und verwende nur vollkommen rund abgeschmolzene Kapillarstücke.

Nicht vermeiden läßt sich, daß sich allmählich in dem die Röhren erfüllenden sauren Wasser Pilze bilden; man erschwert es durch Zusatz einer reichlichen Menge Kupfersulfat zu der durch Rosolsäure gelbgefärbten Lösung, sowie dadurch, daß man immer nur frisch filtriertes Wasser in das Niveaurohr eingießt und das in ihm angesammelte immer wieder filtriert. Haben sich aber an der Innenwand der Röhren Pilzkulturen gebildet, die das Anhaften von Tropfen an der Wand auch bei langsamem Herunterlassen der Lösung begünstigen, so bleibt nichts übrig, als die Röhren durch Chromsäure und Schwefelsäure zu reinigen.

Beispiele der Genauigkeit, die man mit dieser Methodik unschwer erreichen kann, bieten folgende Analysen:

I. Respirationsversuch.

Mit älteren, reparierten Röhren mit sehr hohen Kaliberkorrekturen.

Gasproben Ablesung	Rohrkorrektur	TB-korrektur	Resultat %	TB Ablesung	Resultat %	TB korrektur	Rohrkorrektur	Gasproben Ablesung
99·75	100·33	—	100·00	93·85	100·00	—	100·09	100·08
96·45	96·45	96·40	96·08	93·90	96·09	96·17	96·22	96·20
79·53	80·03	79·91	79·64	94·00	79·63	79·69	79·81	79·89

Endresultat: 3·92% CO_2 und 16·44% O_2.

II. Sauerstoffreiche Gemische.

	TB Thermobarometer Ablesung cm^3	B Gasprobe Ablesung cm^3	Rohrkorrektur (Fehler der Bürettenkalibrierung)	B korrigiert infolge TB-Änderung	Differenz N cm^3	[illegible]
Gasprobe A, 1 . .	93·95	100·02	100·04	—	—	100·00
— CO_2	93·98	98·90	98·88	98·85	—	98·81
N-Rest in Stickstoffbürette . .	94·01	13·08	12·95	12·94	—	—
+ N-Rest der Gasprobe	94·05	23·08	22·87	22·84	9·90	9·90
Gasprobe A, 2 . .	94·11	100·07	100·09	—	—	100·00
N-Rest in Stickstoffbürette . .	94·12	13·06	12·93	12·93	—	—
+ N-Rest der Gasprobe	94·18	23·07	22·86	22·84	9·91	9·90

	TB-Thermobarometer Ablesung	B Gasprobe cm^3 Ablesung	Rohrkorrektur (Fehler der Bürettenkalibrierung	B korrigiert infolge TB-Änderung	Differenz N cm^3	%
Gasprobe B, 1 . .	94·63	100·00	100·02	—	—	100·00
N-Rest in Stickstoffbürette . .	94·65	—	—	—	—	—
N-Rest der Gasprobe . . .	94·69	29·10	28·88	28·87	28·87	28·87
Gasprobe B, 2 . .	94·67	99·98	100·00	—	—	100·00
N-Rest in Stickstoffbürette . .	94·68	—	—	—	—	—
N-Rest der Gasprobe	94·69	29·07	28·85	28·85	28·85	28·85

Bedenkt man, daß 3 Doppelanalysen von Luft oder Respirationsgas etwa 70 Minuten erfordern, da man während der Absorption im Phosphor schon eine neue Probe einlassen und abmessen kann und die Gase aus den Pipetten zugleich in 4 Büretten einlassen kann, und daß eine Doppelanalyse von sauerstoffreichem Gemisch auch nicht über eine halbe Stunde dauert (20° Zimmertemperatur angenommen), so dürfte wohl schwerlich eine andere Methodik schneller und bequemer arbeiten. Auch die Genauigkeit von 0·01—0·03 Vol.-% CO_2 und von 0·01—0·02 Vol.-% O_2 genügt für die meisten Fälle.

Neue Apparate für Stoffwechselversuche.[1]

Von **Wilhelm Völtz**, Charlottenburg.

A. Stoffwechselapparate für Hunde.

1. Harntrichter für männliche Hunde.

In diesem Handbuch[2] ist bereits ein Harntrichter für ausgewachsene Hunde beschrieben worden. Die folgende Fig. 237 zeigt einen in der Form etwas abweichenden Harntrichter für junge Hunde.

Während der obere Rand des Harntrichters für ausgewachsene Hunde entsprechend der Aufgeschürztheit des Abdomens bei letzteren etwas konvex oder jedenfalls gradlinig sein muß, um ein gutes Anliegen zu bewirken, muß derselbe an den Harntrichtern für junge Hunde konkav sein, um der konvexen Profillinie des Hinterleibes genau anzuliegen. Die Form dieses Trichters ist in der Fig. 237 wiedergegeben. Der Harn fließt von Fig. 237 *A* durch das Rohr Fig. 237 *C* und einen auf letzteres auf gestreiften Gummischlauch in die Harnflasche. Fig. 237 *B* und *B*¹ Ösen zur Anbringung des Riemens und der Schnalle, die auf dem Rücken des Tieres in der Lendengegend befestigt werden, wie in der früheren Publikation (l. c.) genauer angegeben. In den beiden seitlichen Trichterwänden muß je eine Öffnung vorhanden sein, wie aus der Fig. 237 ersichtlich, um den Luftzutritt zum Innenraum des Trichters zu ermöglichen, denn bisweilen schließt letzterer so vollkommen, daß bei Nichtvorhandensein solcher Öffnungen eventuell eine Stauung von Harn im Trichter eintreten könnte.

Fig. 237.

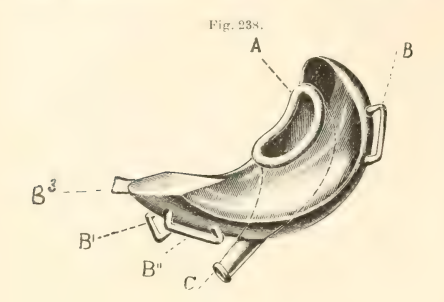
[1] Sämtliche Apparate sind bei den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin N. 39, Scharnhorststr. 22, erhältlich.

[2] *W. Völtz*, Stoffwechselversuche an Hunden, Wiederkäuern und Vögeln etc. S. 1040—1063. 1910.

2. Harntrichter für Hündinnen.

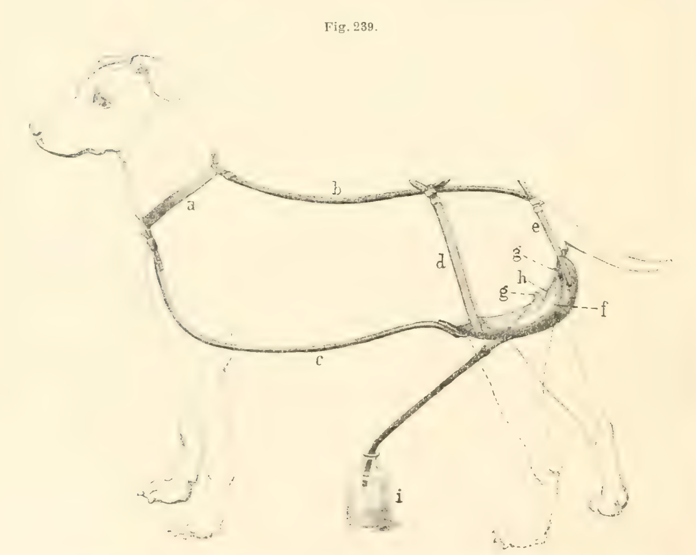
Ein trichterförmiges Rohr umschließt mit dem oberen, vorspringenden, abgerundeten Rande (Fig. 238 *A*) die Vulva. Um dieses Rohr am Tierkörper gut zu fixieren, wird an dasselbe ein Mantel gelötet, dessen Form aus der Fig. 238 ersichtlich ist.

Fig. 238.



Der in den Trichter gelassene Harn fließt durch das Rohr *C* (Fig. 238) und den auf dasselbe gestreiften Gummischlauch in die Harnflasche. B, B¹, B² und B³ (Fig 238) Ösen zur Anbringung von Riemen. Die mit B korre-

Fig. 239.



a Halsriemen. — *b* Rückenriemen. — *c* Bauchriemen vom Hals zum Trichter. — *d* Verbindungsriemen zwischen Rückenstück und vorderen Teil des Harntrichters. — *e* Verbindungsriemen zwischen Rückenstück und hinteren Teil des Harntrichters. — *f* Harntrichter, — *g* Wulst des Harntrichters, der die Vulva umschließt. — *h* Vulva. — *i* Harnflasche, die man sich unterhalb des Standes der Tiere zu denken hat.

spondierende vierte Öse auf der rechten Seite des Trichters ist auf der Fig. 238 nicht zu sehen.

Die Fig. 239 zeigt die Anbringung des Trichters zwischen den Schenkeln einer Hündin und die Anordnung des Riemenzeuges, um den Trichter zu fixieren.

Der Bauchriemen (Fig. 239, *c*) wird an der vordersten Öse (Fig. 238 *B* [3]) des Harntrichters befestigt, zwischen den vorderen Extremitäten des Tieres, dem Brustbein aufliegend, durchgeführt und an der unteren Seite des Halsbandes angeschnallt. Der Rückenriemen (Fig. 239, *b*) verlauft auf der Rückenmitte von der Schwanzwurzel bis zum hinteren oberen Rande des Halsbandes.

Der Harntrichter paßt Hündinnen verschiedener Größe so gut, daß derselbe, auch wenn die Tiere laufen, seine Lage nicht ändert. Nur für sehr kleine oder sehr große Tiere sind entsprechend kleinere oder größere Trichter zu verwenden.

Die Trichter bestehen aus Messingblech, sind innen verzinnt und außen vernickelt. Die Benutzung eines solchen Trichters ist notwendig, wenn es sich um Tiere handelt, die auf der Tretbahn täglich Laufarbeit leisten sollen. Die Anbringung des Schlauches an den Trichter und die seitliche Herausführung desselben aus der Tretbahn zur Harnflasche, wie sie in der früheren Publikation (l. c.) für männliche Hunde beschrieben ist, behindert die Tiere so gut wie gar nicht, schließt dagegen auch den kleinsten Harnverlust aus, der anderntalls leicht eintreten kann und der eventuell, wenn man das Tier nicht unausgesetzt scharf beobachtet, nicht wahrgenommen wird.

B. Apparate für Stoffwechselversuche an Schafen.

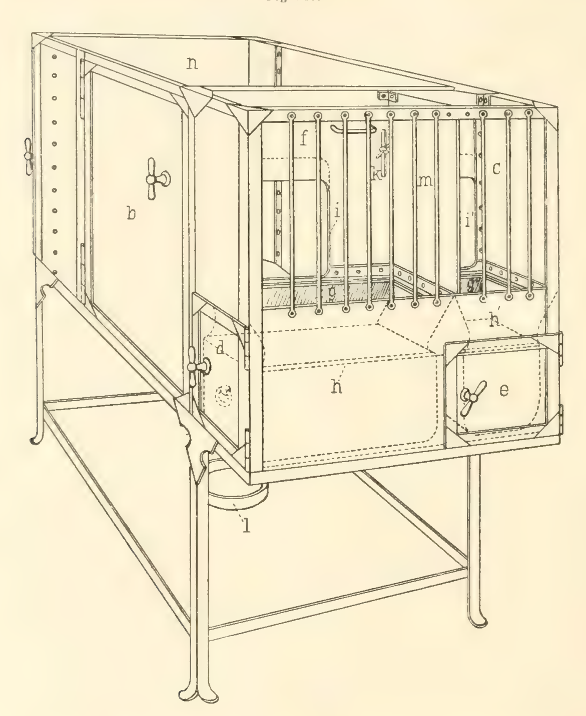
1. Der Stoffwechselkäfig (Fig. 240).

Derselbe besteht aus einem eisernen, entsprechend starken Rahmen mit Eisenblechwänden und ist mit einer geeigneten Farbe gestrichen, die vor Rost schützt. Abweichend von der bisher meist üblichen Anordnung sind die aus emailliertem Eisenblech bestehenden Gefäße zur Aufnahme des Futters und des Trinkwassers nebeneinander angebracht (Fig. 240, *h* beziehungsweise *h*[1]).

Diese Behälter werden durch eine seitliche Türöffnung (Fig. 240, *d*) in die vordere Abteilung des Käfigs geschoben, welche durch eine mit 2 Öffnungen zum Durchstecken des Kopfes versehene Scheidewand (Fig. 240, *f*) von dem hinteren Teile des Käfigs getrennt wird, der als Stand für das Tier bestimmt ist. Die Kanten der Gefäße sind in allen Teilen abgerundet, um eine möglichst leichte Reinigung derselben bewirken zu können. Das Wassergefäß (Fig. 240, *h*[1]) kann auch durch eine besondere kleine Tür (Fig. 240, *e*) von vorn herausgezogen, bzw. eingebracht werden. Zwischen beiden Krippen ist eine Scheidewand (Fig. 240, *m*) vorhanden, damit das Tier nicht ohne weiteres zu beiden Behältern gelangen kann. Es muß vielmehr zu dem Zweck jedesmal den Kopf erst aus der einen Öffnung (Fig. 240, *i* bzw. Fig. 240, *i*[1])

herausstecken, um dann durch die andere Öffnung an den Inhalt des betreffenden Gefäßes heranzukommen. Diese Öffnungen (Fig. 240, *i* bzw. *i'*) können durch eine besondere Vorrichtung (Fig. 240, *k*) vergrößert resp. verkleinert werden. Über beiden Krippen befinden sich trichterförmige feste Einsätze (Fig. 240, *g* und *g'*), welche im unteren Teil ein geringeres Lumen besitzen als die darunter stehenden Behälter. Durch diese Konstruktion wird bewirkt, daß Futterbestandteile, welche das Tier mit den Lippen heraus-

Fig. 240.



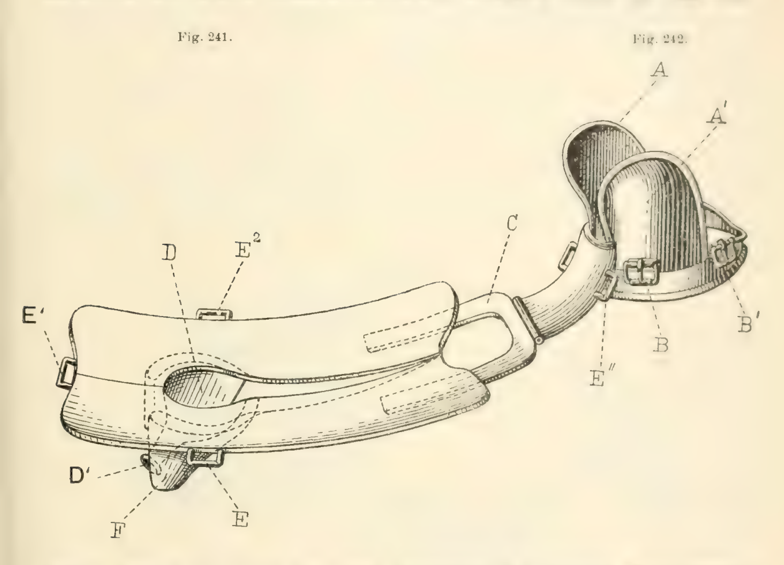
hebt und wieder fallen läßt, sofort wieder restlos in das betreffende Gefäß zurückfallen. Die vor und über den Futtergefäßen befindliche Vorderwand des Käfigs besteht aus Gitterstäben, um das Schaf leicht beobachten zu können. Um bequem zu beiden Abteilungen des Käfigs gelangen zu können, sind 2 entsprechende Türen an einer Seite vorgesehen, von denen die eine (Fig. 240, *b*) nach links, die andere (Fig. 240, *d*) nach rechts geöffnet werden kann. Außerdem befindet sich auf der Rückseite des Käfigs

eine Tür (Fig. 240, *n*). Der vom Harntrichter abführende Schlauch wird durch eine am Boden des Käfigs befindliche, auf der Fig. 240 nicht sichtbare Öffnung hindurchgezogen, um von hier in die auf einer darunter befindlichen Platte (Fig. 240, *l*) stehende Harnflasche gesteckt zu werden.

2. Harntrichter (Fig. 241) und Kotfänger (Fig. 242) für männliche Schafe.

Der bisher meist übliche Harntrichter hatte insofern einen Nachteil, als beim Liegen des Tieres die Last des Körpers zum Teil auf dem Rande des mit steilen Wänden versehenen Trichters ruhte, so daß bis-

Fig. 241. Fig. 242.



weilen, wenn nicht durch besondere Polsterung des Randes Hautabschürfungen verhütet wurden, letztere schwer zu vermeiden waren. Diesem Übelstand ist abgeholfen durch den in Fig. 241 dargestellten Harntrichter, welcher mit seiner ganzen Fläche dem Leib des Tieres aufliegt und nur eine entsprechende, schlitzartige, sich nach vorn erweiternde Öffnung zur Aufnahme des Penis (Fig. 241, *D*) aufweist.

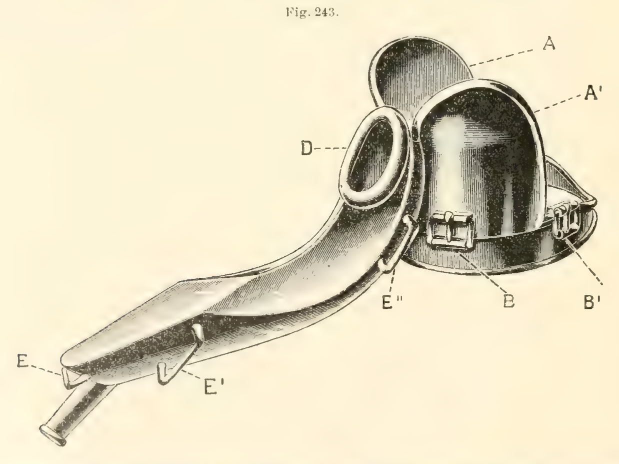
Die im vorderen Teil des Trichters erweiterte Öffnung geht in ein Ansatzrohr über (Fig. 241, *D'*), über das ein Schlauch zwecks Ableitung des Urins zur Flasche gestreift wird. Um ein Abklemmen des Schlauches zu verhindern, ist das Ansatzrohr mit einem halbkreisförmigen, vorn offenen starken Fuß (Fig. 241, *F*) versehen, auf dem der Trichter ruht, wenn das Tier liegt. *E*, *E'* und *E''* Ösen zur Anbringung der Riemen.

Durch eine entsprechende, gleich zu beschreibende Vorrichtung ist an diesem Harntrichter der Kotfänger (Fig. 242) angebracht, welcher zwischen den Hinterschenkeln, deren äußeren Form er genau angepaßt ist, befestigt wird. Derselbe wird durch Riemen in dieser Lage fixiert. An dem hinteren Rand des Kotfängers ist ein Ring mit einer Anzahl Schnallen zur Befestigung des Kotbeutels angelötet. Zwei seitliche Metallflügel verhindern ein Abgleiten des Kotes über den äußeren Rand des Ringes, welches andernfalls leicht eintreten würde, wenn des Tier liegend den Kot absetzt. Am vorderen Ende des Kotfängers ist durch ein Scharnier die Verbindung mit einer Gabel hergestellt, welche das Skrotum umfängt und mit dem Harntrichter (Fig. 241) in entsprechender Weise verbunden ist. Die besondere Anbringung des Riemenzeuges mittelst eines Kummets ist aus der betreffenden Abbildung für weibliche Schafe (Fig. 245) zu ersehen.

3. Harntrichter, Kotfänger und Vorrichtungen zum Anbringen derselben bei weiblichen Schafen.

Die Form des Harntrichters für weibliche Schafe zeigt die folgende Fig. 243, die im Prinzip dem Harntrichter für Hündinnen entspricht, außerdem jedoch gleichzeitig durch einen besonderen ringförmigen Ansatz mit

Fig. 243.



2 Flügeln (Fig. 243 *A* und *A'*) und einer Anzahl Schnallen (Fig. 243 *B* und *B'*) die Anbringung des Kotbeutels und die Sammlung des Kotes ermöglicht. Fig. 243 *D* ringförmiger Wulst, der die Vulva umschließt. Fig. 243 *E*, *E'* und *E''* Ösen zur Anbringung der Riemen.

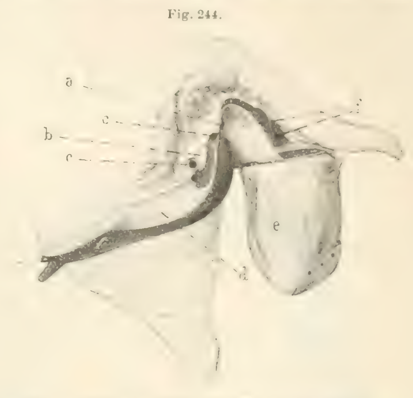
Dieser Trichter ist ebenso wie der bereits beschriebene für Hündinnen und Hunde aus Messing gefertigt, außen vernickelt, innen verzinnt.

Die Stellung des angebrachten Trichters zeigt die Fig. 244.

Trotz der beim Schaf sehr geringen Entfernung von Vulva und Anus gelingt die Gewinnung und Trennung von Harn und Fäzes mittelst des in Fig. 244 dargestellten Trichters leicht quantitativ. Der Trichter bleibt nicht nur beim Stehen und Liegen des Tieres unverändert in seiner Lage, sondern er wird auch nicht aus derselben entfernt, wenn man das Tier laufen läßt.

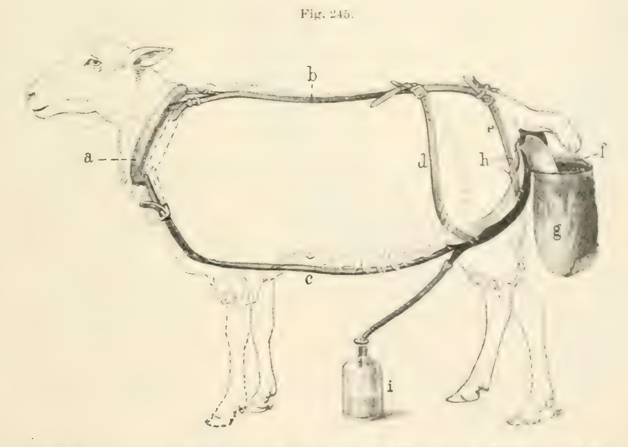
In Fig. 245 ist die Befestigung des kombinierten Harn-Kotfängers mittelst Riemenzeuges so dargestellt, daß auf eine besondere Erläuterung der Einzelheiten wohl verzichtet werden darf.

Fig. 244.



a Anus. — *b* Vulva. — Wulst des Harntrichters (durchschnitten). — *d* Harntrichter. — *e* Kotbeutel. — *f* Flügel des Kotbeutels.

Fig. 245.

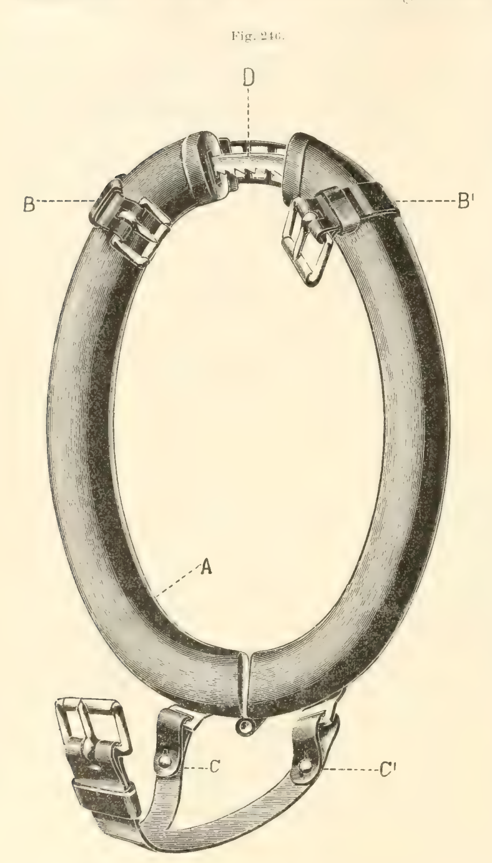


a Kummet. — *b* Rückenriemen. — *c* Bauchriemen vom Kummet zum Trichter. — *d* Verbindungsriemen zwischen Rückenstück und vorderem Teil des Harntrichters. — *e* Verbindungsriemen zwischen Rückenstück und hinterem Teil des Harntrichters. — *f* Ring zum Anschnallen des Kotbeutels. — *g* Kotbeutel. — *h* Wulst des Harntrichters, der die Vulva umschließt. — *i* Harnflasche, die man sich unterhalb des Standes des Tieres zu denken hat.

Es sei nur hervorgehoben, daß die Verwendung eines Kummets, wie solches in Fig. 246 noch besonders zur Darstellung gebracht wird, wesent-

liche Vorzüge vor dem bisher meist üblichen Halsriemen besitzt. Das Kummet kann entweder aus Holz, z. B. aus Eschenholz oder aus Weißbuchenholz etc., oder auch aus Metallrohr gefertigt werden. Dasselbe paßt Tieren verschiedener Größe und es ist im allgemeinen nicht erforderlich, ein verstellbares Kummet zu benutzen; ist das aus besonderen Gründen erwünscht, so kann die Verstellbarkeit z. B. in der Weise erfolgen, wie aus Fig. 246, *d* ersichtlich.

Fig. 246.



Wenn übrigens das Kummet, so wie es in der Fig. 246 dargestellt ist, am lebenden Tier fixiert sein soll, ist es erforderlich, um eine Verletzung des Tieres zu verhüten, eine geeignete Lederkappe über die beiden oberen Enden des Kummets zu knöpfen, die in der Fig. 246 nicht zur Darstellung gebracht ist, um die Zeichnung der Stellvorrichtung nicht zu verdecken. Durch die Verwendung eines Kummets werden jegliche Druckschäden, also Hautabschürfungen etc., ausgeschlossen[1]) und vor allem bleibt der Rückenriemen stets in seiner Lage fixiert.

Um die Zeichnung Fig. 245 nicht allzusehr zu vergrößern, ist die Harnflasche, ebenso wie in Fig. 239 bei der Hündin zwischen den Vorder- und Hinterfüßen des Tieres gezeichnet worden. In Wirklichkeit ist das natürlich nicht angängig, sondern der Schlauch muß,

[1]) Die natürlich bei der Verwendung eines gepolsterten Riemens auch nicht eintreten können.

wie bereits beschrieben, durch eine besondere, am Boden befindliche Öffnung in die unter demselben stehende Flasche, bzw. bei Hunden seitlich aus der Tretbahn geführt werden.

Bezüglich des Materials der zu verwendenden Schläuche möchte ich bemerken, daß sich der reine Paragummi nach meinen Erfahrungen hierzu am besten eignet. Schläuche aus anderen Gummisorten, speziell mit hohem Gehalt an anorganischen Bestandteilen, werden insbesondere durch den Urin von Wiederkäuern bald brüchig und unbrauchbar.

C. Stoffwechselkäfig für Ratten.

Zu einem Stoffwechselkäfig für Ratten kann man zweckmäßig eine Flasche mit abgesprengtem Boden benutzen, wie sie in der Fig. 247 zur Darstellung gebracht wird.

Der Durchmesser des Bodens dieser Flasche beträgt zirka 25 *cm*. Die sich nach dem Flaschenhals zu trichterartig verjüngende Flasche erhält 2 aus Glasstäben gefertigte Einsätze, deren unterer (Fig. 247, *E*), auf welchem der Kot liegen bleibt, etwa nur 3 *mm* breite Öffnungen aufweist, welche den Harn durchfließen lassen. Der obere, mit Glasfüßen versehene Einsatz (Fig. 247, *D*), welcher einen Abstand von zirka 3—5 *cm* von dem unteren Einsatz (Fig. 247, *E*) hält, dient als Boden für das Versuchstier.

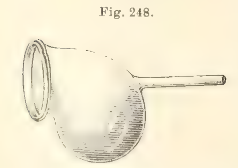
Die Glasstäbe sind hier weiter, zirka 8—10 *mm*, voneinander entfernt, um Kot und Harn hindurchfallen zu lassen. Letzterer fließt durch den unteren Einsatz (Fig. 247, *E*) in das unter den Käfig gestellte Becherglas (Fig. 247, *K*). Zirka 20 *mm* über dem oberen Einsatz (Fig. 247, *D*) weist der Käfig 2 runde Öffnungen von je 30—35 *mm* Durchmesser auf, um das Hindurchstecken des Kopfes zwecks Futter- und Wasseraufnahme zu ermöglichen. Einige kleinere Durchbohrungen von zirka 10 *mm* Durchmesser (zirka 8—10 *cm* über dem oberen Einsatz) sorgen für genügende Luftzufuhr. Fig. 247, *G* und *G'* bzw. Fig. 248 zeigen die als Futtergefäße dienenden Glasnäpfe, welche bei der aus den Figuren ersichtlichen Stellung zirka 25 *cm*³ fassen. Die Anbringung dieser Futternäpfe erfolgt in der Weise, daß Glasleisten mit Falz zu beiden Seiten und unterhalb der Öffnung z. B. mit Kanadabalsam oder Natronwasserglas aufgekittet werden, welche das Hineinschieben und somit Fixieren der Glasränder der Näpfe gestatten.

Die Auswechslung der Gläser und Reinigung derselben geschieht in sehr leichter Weise, auch ist der Käfig leicht und vollkommen zu reinigen. Bekanntlich fressen die Ratten das Futter vorzugsweise aus den Vorderpfoten und verstreuen es während des Fressens zum Teil vor dem Futternapf. Um nun ein Durchfallen von Futterbestandteilen durch den Glaseinsatz nach Möglichkeit zu verhindern, wird zweckmäßig eine umränderte Platte, der aus Fig. 247, *H* ersichtlichen Form, die ich als Futtertisch bezeichnen möchte, vor dem Futternapf angebracht. Der abgesprengte Boden der Flasche (Fig. 247, *B*) dient als Deckel des Käfigs und weist

Fig. 247.

einige Öffnungen auf, um den Lufteintritt zu gestatten; erforderlichenfalls kann eine kontinuierliche Ventilation des Käfigs, z. B. mittelst einer kleinen Wasserstrahlpumpe, leicht erfolgen. Um ein Abgleiten und Herabfallen des Deckels auszuschließen, kittet man zweckmäßig unterhalb desselben an den unteren äußeren Flaschenrand zirka 3 darübergreifende Glas- oder Porzellanleisten (Fig. 247, *C*). Statt des als Deckel dienenden Glasbodens der Flasche kann ein Deckel aus engmaschigem Drahtnetz benutzt werden. Der Käfig wird auf einen

Fig. 248.

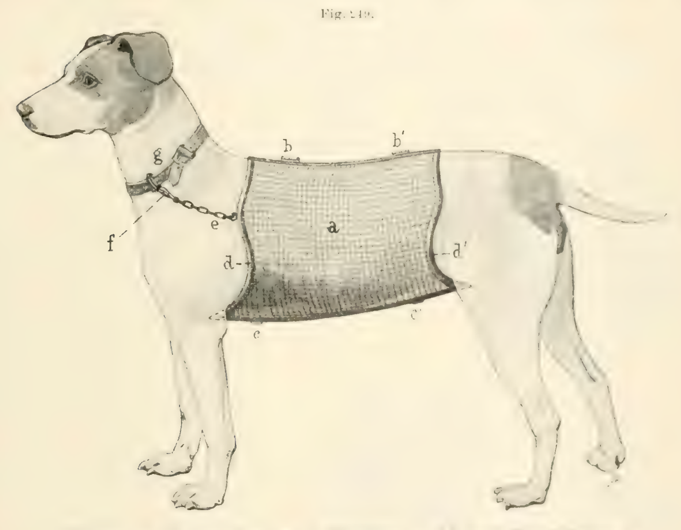


gut passenden eisernen Dreifuß, wie derselbe in Fig. 247, *F* dargestellt ist, gesetzt. Es sei schließlich noch bemerkt, daß vor die Öffnungen engmaschiges Drahtnetz zu bringen ist, um kleinen Insekten das Eindringen in den Käfig zu wehren.

D. Korsett aus Drahtnetz für Hunde.

Nach der Ausführung von Vivisektionen speziell im Bereiche des Abdomens, also beispielsweise nach der Anlegung von Magen- und Darmfisteln, Einführung von Kanülen etc., ist es zumeist sehr schwierig, die

Fig. 249.



a Drahtnetz. — *b b′* Verschlüsse. — *c c′* Scharniere. — *d d′* runde Blecheinfassung. — *e* Kette. — *f* Karabinerhaken zum Befestigen am Halsbande. — *g* Halsband mit zwei Ringen.

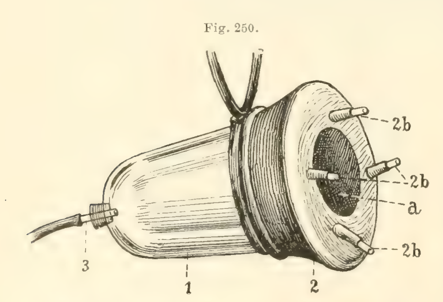
Hunde so zu bandagieren, daß sie nicht an das Operationsfeld, sei es mit den Zähnen, oder wenn sie einen Maulkorb tragen, mit den Pfoten gelangen können. Ein Freilassen so operierter Tiere nach Heilung der Wunde, welches im Interesse der längeren Gesunderhaltung sehr erwünscht wäre, ist zumeist ausgeschlossen, wenn man nur Bandagen aus Leinen, Baumwolle etc. auch mit darüber angebrachter Lederbinde anwendet. Das in der folgenden Fig. 249 dargestellte Korsett beseitigt diese Übelstände und verhindert auch vor allem, daß die Tiere durch Artgenossen, mit denen sie zusammen, z. B. in einem dazu bestimmten Raum, im Freien untergebracht sind, an den operierten Organen verletzt werden.

Das Korsett Fig. 249, *a* ist leicht um 2 ventral angebrachte Scharniere (Fig. 249, *c* und *c'*) auseinander zu klappen. Es wird auf dem Rücken durch eine entsprechende Vorrichtung, z. B. durch Karabinerhaken (Fig. 249, *b* und *b'*), befestigt und weiterhin, um ein Abstreifen über das Becken zu verhindern[1], durch 2 Ketten am Halsband fixiert. Für männliche Hunde muß dieses Korsett einen entsprechenden Schlitz aufweisen, um eine Verletzung des Penis auszuschließen und denselben, ohne daß er vom Korsett berührt wird, hindurchtreten zu lassen. Auf die vorderen und hinteren Ränder (Fig. 249, *d* und *d'*) dieses Drahtnetzes ist Metallrohr mit rundem Querschnitt und zirka 10—15 *mm* Stärke aufzulöten, damit eine Verletzung der Ellenbogen, der hinteren Winkel der Schulterblätter und der Knie, die anderntalls leicht vorkommen würde, verhindert wird. Durch das Korsett werden die Bandagen gut fixiert. So ausgerüstete Hunde kann man nach Heilung der Wunde frei umherlaufen lassen und sie dadurch länger für Versuchszwecke gesund erhalten, als es bei dauerndem Aufenthalt im engen Käfig und Laboratorium oder Stall möglich wäre.

E. Apparate zur quantitativen Bestimmung des Alkohols der Atmung an Hunden bei Ruhe und Muskelarbeit.[2]

1. Eine Glasglocke mit Gummikappe zwecks Bestimmung des exhalierten Alkohols bei Ruhe (Fig. 250). Über die Öffnung der Glocke (*1*) wird eine Gummikappe (*2*) gestreift, durch die (*a*) der Kopf des Tieres hindurchgesteckt werden kann. Der innere Rand der Gummikappe umfängt den Hals des Versuchstieres. Einige Öffnungen in der Kappe (*2 b*), in die kurze Glasröhren gesteckt werden, gestatten den Luftzutritt zum Innenraum der Glocke. Der Gummikappe gegenüber wird die Mitte der Glocke durchbohrt, um einen Gummistopfen mit Glasrohr einzufügen (*3*), durch welches die an dem Kopf des Tieres

Fig. 250.



1 Glasglocke. — *2* Gummikappe. — *a* Öffnung zum Durchstecken des Kopfes. — *2 b* Glasröhren zur Luftzufuhr. — *3* Glasrohr zur Luftableitung.

vorbeistreichende Luft durchgesaugt wird, welche sodann die zur Oxydation des Alkohols eingeschalteten Bichromatschwefelsäurevorlagen und zuletzt die Luftpumpe passiert. Da Hunde lediglich durch die Maulhöhle und die Nase Wasserdampf und somit Alkohol ausatmen, gelingt es, durch

[1]) Ein Abstreifen über das Vorderteil des Körpers kommt nicht in Frage.

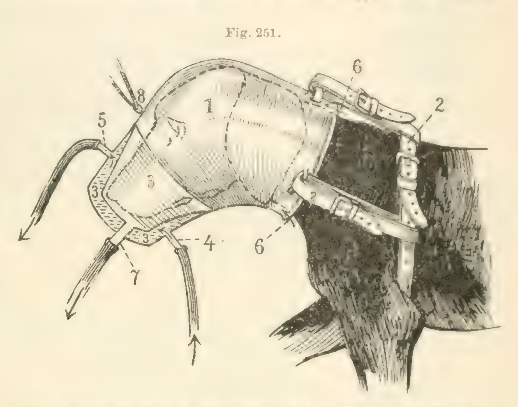
[2]) Siehe auch *Pflügers* Archiv für die gesamte Physiologie, Bd. **142**, S. 48—52. 1911.

diese Anordnung den exhalierten Alkohol quantitativ zu bestimmen. Die Glasglocke ist übrigens nur bei Ruheversuchen zu verwenden, weil dem Tier die physikalische Wärmeregulation bei Arbeit in dem ungekühlten Raum nur sehr unvollkommen möglich ist.

2. Auf demselben Prinzip beruht die Konstruktion einer Blechmaske, welche für die Arbeitsversuche noch mit Kühlmantel versehen wird. Die Fig. 251 zeigt das Vorderteil eines mit entsprechendem Geschirr (*2*) und Maske (*1*) armierten Hundes.

Die Blechhaube (*1*) gestattet eben das Hindurchstecken des Kopfes. Der Maulhöhle gegenüber trägt die Haube ein Ansatzrohr (*7*), durch das die von der Luftpumpe angesaugte und am Halse (*6*) und Kopf des Tieres vorbeiströmende Luft abgeleitet wird und sodann die Vorlagen und schließlich die Pumpe passiert. Um dem Hund die physikalische Wärmeregulation bei der Mukelarbeit zu erleichtern, bzw. in genügender Weise zu ermöglichen, ist um den vorderen Teil der Maske ein Blechmantel (*3*) gelötet, der für Wasserkühlung bestimmt ist und zu dem Zweck zwei Ansatzrohre (*4* und *5*) trägt, auf die Gummischläuche gestreift werden; durch das Rohr *4* strömt das Wasser während der Arbeitsversuche kontinuierlich ein, durch das Rohr *5* ab. Durch eine Öse (*8*) wird schließlich eine Schnur gezogen, an der die Maske bei der Laufarbeit in zweckmäßiger Höhe aufgehängt werden kann, um dem Tier das Tragen derselben zu erleichtern.

Fig. 251.



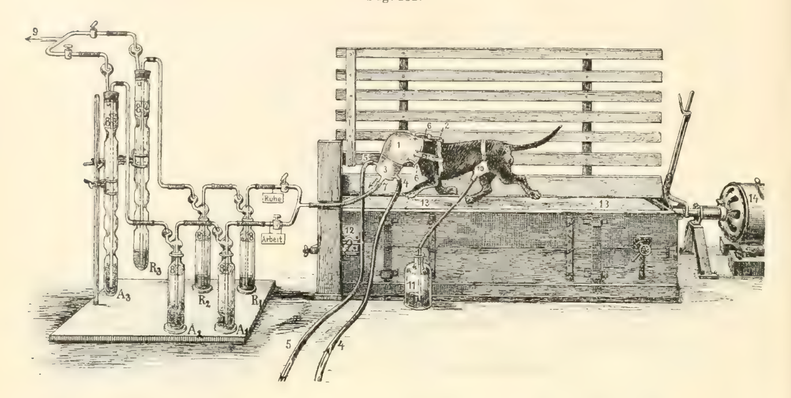
1 Maske (Blechhaube). — *2* Geschirr. — *3* Wassermantel. — *4* Wasserzufluß. — *5* Wasserabfluß. — *6* Luftzufuhr. — *7* Luftableitung. — *8* Öse zur Anbringung einer Schnur.

3. Anordnung der Apparatur während eines Arbeitsversuches auf der Tretbahn (Fig. 252). Die Vorderwand der Tretbahn (*13*) ist fortgedacht, um eine bessere Übersicht zu gestatten.

Die Armierung des Tieres mit Harntrichter, Geschirr und der mit Wasserkühlung versehenen Maske ist bereits beschrieben worden. Die Anordnung der Vorlagen ist derart getroffen, daß eine quantitative Trennung der bei Arbeit einerseits und während der Ruhepausen andererseits ausgeatmeten Alkoholmengen leicht möglich ist, wie aus der Figur ersichtlich. Zu dem Zweck ist der über das Ansatzrohr (*7*) gestreifte Schlauch zunächst mit einem T-Stück verbunden. Je nach der Schaltung der an den

beiden anderen Schenkeln des T-Rohres befindlichen Glashähne muß der exhalierte Alkohol die Vorlagen A_1, A_2 und A_3, wie im vorliegenden Fall bei einem Arbeitsversuch, bzw. die Vorlagen R_1, R_2 und R_3 während der Ruhepausen passieren. Statt der je zwei Hähne, welche vor und hinter den Vorlagen in den beiden T-Rohren vorhanden sind, könnte man sich ebensogut eines Zweiweghahnes bedienen. Als Vorlagen werden je 2 Wasch-

Fig. 252.



1 Maske (Blechhaube). — *2* Geschirr. — *3* Wassermantel. — *4* Wasserzufluß. — *5* Wasserabfluß. — *6* Luftzufuhr. — *7* Luftleitungsrohr zu den Vorlagen. — *8* Glaswolle. — *9* Zur Luftpumpe. — *10* Harntrichter mit Schlauch. — *11* Harnflasche. — *12* Tourenzähler. — *13* Tretbahn. — *14* Motor. — A_1, A_2 und A_3 Vorlagen für die Arbeitsversuche. — R_1, R_2 und R_3 Vorlagen für die Ruheversuche.

flaschen, wie sie für *Kipp*sche Apparate üblich sind, benutzt und dahinter noch eine längere Glasröhre geschaltet. Um ein Hinüberspritzen der bei starker Luftströmung mitgerissenen Tropfen aus einer Vorlage in die nächste zu verhindern, wird in die oberen Teile der Vorlagen Glaswolle eingeführt und als letzte Vorlage ein Glasrohr benutzt, welches schon durch seine Länge ein Hinüberreißen von Tropfen der Lösung ausschließt.

Ergänzungen zur Aschenanalyse.

(Band I, S. 372—428.)

Von **Georg Lockemann**, Berlin.

Herstellung einer Asche.

Zu S. 377.[1])

Zu S. 380. Zur Durchführung einer möglichst langsamen Erhitzung und gleichmäßigen Veraschung hat *Edmond J. Aps*[2]) einen Apparat konstruiert, der dann von der Firma *Dr. Hodes u. Göbel*[3]) in Ilmenau modifiziert und in den Handel gebracht wurde.

Fig. 253.

Auf einem Dreifuß, dessen Ring *R* (siehe Fig. 253) ein rinnenförmiges Kugellager enthält, wird eine die Stützen für die Tiegelhalter tragende Ringscheibe *S* mit schräger Seitenfläche mittelst eines Keilantriebes *K* in Bewegung gesetzt; die kleine Vollscheibe *s* verhindert das Hochkippen von *S*. Die Träger *T* sind an der Spitze eingekerbt, um Dreiecke von verschiedener Seitenlänge aufnehmen zu können. Die Flamme des mit gebogenem Aufsatz versehenen Brenners bespült den Tiegel *t* von der

---

[1]) Die Angaben beziehen sich auf Bd. **1** des Handbuches.

[2]) *Edm. J. Aps*, Ein neuer Apparat zur sicheren und langsamen Veraschung. Chemiker-Zeitung. Bd. **34** (1910). S. 1374.

[3]) Apparat zur sicheren und gleichmäßigen Veraschung. Chemiker-Zeitung. Bd. **35** (1911). S. 488.

Seite, so daß auf der Gegenseite stets wieder Sauerstoff zutreten kann. Es lassen sich mehrere Dreifüße der angegebenen Konstruktion nebeneinander aufstellen, ohne daß eine weitere Antriebsvorrichtung nötig ist, da dann die Ringschichten *S* sich gegenseitig in Bewegung setzen; die Scheibe *s* fällt dann weg.

Bei diesem Apparat wird eine Überhitzung einzelner Stellen völlig vermieden: durch Änderung der Drehungsgeschwindigkeit und der Flammengröße läßt sich die Veraschungstemperatur beliebig regulieren. Auch hochsiedende Flüssigkeiten, wie konz. Schwefelsäure, Glyzerin usw., lassen sich auf diese Weise leicht abrauchen und die darin eventuell gelösten Stoffe können so ohne weiters verascht werden. Das Verflüchtigen von Alkalisalzen, sowie das durch zu schnelles Erhitzen verursachte Verspritzen von dekrepitierendem Kochsalz wird ebenfalls vermieden.

Zu S. 380. Um die vollständige Oxydation der einzuaschenden Substanz zu beschleunigen, kann man sie mit Ammoniumnitrat, von dessen vollständiger Flüchtigkeit man sich zunächst überzeugt, vermischt erhitzen. Das Ammoniumnitrat wird entweder als festes Salz mit dem organischen Material, bezw. der teils verkohlten Asche mit Hilfe eines Platinspatels oder starken Platindrahtes (der natürlich wieder völlig zu reinigen ist, vielleicht mit einem Stückchen aschefreien Fließpapiers, das dann mit verbrannt wird) innig verrührt oder in wässeriger Lösung zugesetzt und unter wiederholtem Umrühren zur Trockne verdampft. Beim Glühen verbrennen dann die kohligen Bestandteile verhältnismäßig leicht. Nach Angabe von *Lassar-Cohn* kann man die angekohlte Substanz auch mit 3%iger Wasserstoffsuperoxydlösung, von deren restloser Flüchtigkeit man sich natürlich auch überzeugen muß, durchfeuchten und dann ebenso verfahren.

Qualitative Analyse einer Asche.

Zu S. 390.

I. Basische Bestandteile.

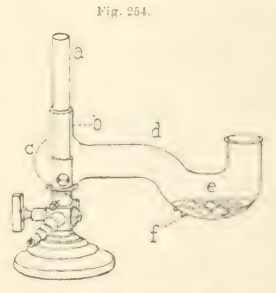
Für die Prüfung auf die basischen Bestandteile einer Asche werden in den meisten Fällen allerdings nur Eisen, die Erdalkalien nebst Magnesium und die Alkalien in Betracht kommen. Hierbei ist zu beachten, daß, wenn es sich um eine am Schluß alkalisch reagierende Schmelze handelt, das **Eisen** sich als braunes Oxyd unlöslich abscheidet und beim Aufnehmen der Schmelze mit Wasser oder verdünnten Säuren einfach abfiltriert werden kann. Ist dieses nicht der Fall und geht das Eisen mit verdünnter Salzsäure z. B. in Lösung, so ist es als Ferroverbindung leicht durch die mit Kaliumferricyanid (rotem Blutlaugensalz) entstehende dunkelblaue Fällung (Turnbullsblau) oder als Ferriverbindung durch die mit Kaliumferrocyanid (gelbem Blutlaugensalz) entstehende dunkelblaue Fällung (Berlinerblau) und die durch Kaliumrhodanid hervorgerufene rote Färbung zu erkennen. Bei Anstellung dieser Reaktionen ist gewisse Vorsicht geboten.

Zu S. 399. Man darf z. B. nicht die zur Überführung von Ferro- in Ferriverbindungen mit Salpetersäure gekochte Lösung in der Hitze mit Kaliumferrocyanid versetzen, da dann auch ohne Anwesenheit von Eisensalzen durch die oxydierende Wirkung der heißen Salpetersäure auf das Ferrocyanid Blaufärbung entstehen kann. Ebenso muß die Rhodanreaktion in der Kälte und unter Ausschluß größerer Mengen von Salpetersäure angestellt werden, denn sonst kann auch einerseits bei völliger Abwesenheit von Eisen eine rotbraune Färbung auftreten, andrerseits kann die durch Eisen wirklich hervorgerufene Rotfärbung wieder zerstört werden.

War das Eisen als unlösliches Oxyd abgeschieden, so läßt es sich durch Erhitzen mit konzentrierter Salzsäure oder 70%iger Schwefelsäure, auf jeden Fall aber durch Schmelzen mit Kaliumbisulfat in Lösung bringen. In welchem Zustande das Eisen ursprünglich in der untersuchten Substanz vorhanden war, das läßt sich natürlich aus der in der Aschenlösung ermittelten Oxydationsstufe nicht ohne weiters schließen.

Zu S. 391. Zum Nachweis der einzelnen **Erdalkalien** und **Alkalien** durch die **Spektralanalyse** bedient man sich am besten der von *E. Beckmann*[1]) angegebenen Methode. Diese besteht darin, daß man die zu untersuchende Lösung durch geeignete Entwicklung von Gasbläschen fein versprüht und diesen salzhaltigen Sprühnebel mit dem für die Bunsenflamme erforderlichen Luftstrom in die Flamme führt. Dadurch wird im Gegensatz zu der alten Platindrahtmethode erreicht, daß die Flamme in ihrem ganzen Umfange kontinuierlich gefärbt wird und somit eine eingehende Betrachtung durch das Spektroskop ermöglicht. Einige Ausführungen der neueren *Beckmann*schen Spektrallampen sind in den Fig. 254, 255 und 256 wiedergegeben.

Fig. 254.



Spektrallampe mit chemischem Zerstäuber.
1/4 wirklicher Größe.

Zur Gasentwicklung (Wasserstoff) benützt man am vorteilhaftesten kleine Zinkstücke, die durch einige Minuten langes Hin- und Herrütteln in einer 1/2%igen Kupfersulfatlösung und nachheriges Abwaschen mit Wasser aktiviert werden.

Fig. 254 zeigt einen gewöhnlichen Bunsenbrenner, der mit einem chemischen Zerstäuber aus Glas[2]) versehen ist. Die Luftzu-

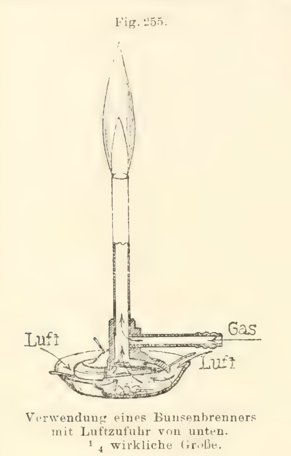
---

[1]) *E. Beckmann*, Über Spektrallampen V. Neue einfache Spektrallampen für das chemische Practicum. Zeitschr. f. physikal. Chemie. Bd. **57** (1907) S. 641. — Farben von Flammen für das analytische Practicum. Zeitschr. f. angewandte Chemie Bd. **20** (1907) S. 561.

[2]) Die hier beschriebenen Vorrichtungen sind von der Firma *O. Preller*, Leipzig, Brüderstraße 55, oder von dem Mechaniker *G. Hildebrandt*, Leipzig, Brüderstraße 34, zu beziehen.

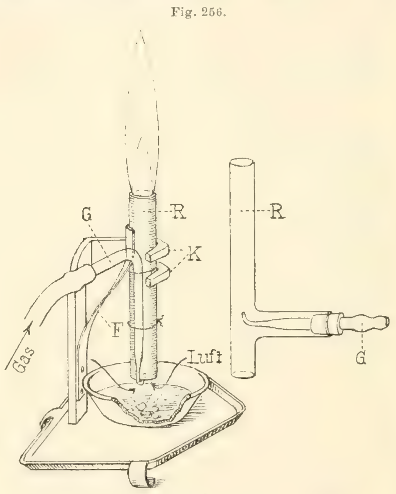
führungsöffnung des Brenners liegt innerhalb der kugligen Erweiterung *c*. Bringt man in den U-förmigen Teil *e* des Zerstäubers die zu untersuchende Salzlösung und gibt dazu etwas verkupfertes Zink und, wenn nicht schon Säure vorhanden, etwas Salzsäure bis zur schwachen Wasserstoffentwicklung, so zeigt die entleuchtete Bunsenflamme alsbald die charakteristische Färbung. Salpetersäure ist natürlich zu vermeiden und Schwefelsäure wäre bei den Erdalkalien selbstverständlich auch nicht angebracht. Der Säurezusatz muß so geregelt werden, daß durch die entwickelten Gasbläschen nur eine trübe Emulsion entsteht, jedenfalls aber die Flüssigkeit sich nicht mit Schaum bedeckt; zu heftige Entwicklung kann durch Eintauchen des Zerstäubers in kaltes Wasser oder durch Verdünnen der Entwicklungsflüssigkeit mit Wasser, bezw. durch vorsichtigen Zusatz von etwas Ammoniak gemäßigt werden. Auf diese Weise kann man mit den geringsten Mengen, eventuell weniger als einem Tropfen Salzlösung Färbungen hervorrufen. Für gewöhnlich wird es sich empfehlen, vielleicht 5 *cm*³ Flüssigkeit zu verwenden.

Fig. 255.



Verwendung eines Bunsenbrenners mit Luftzufuhr von unten. ¼ wirkliche Größe.

Fig. 256.



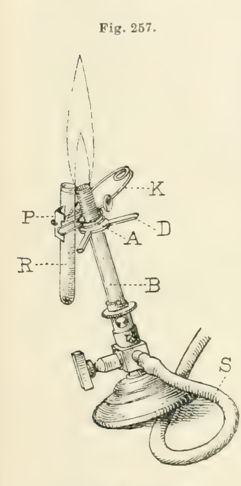
Brenner aus Porzellan oder Kaliglas mit Stativ. ¼ wirkliche Größe.

Eine *Beckmann*sche Spektrallampe mit chemischer Zerstäubung kann man sich auch ohne besondere Apparatur herstellen, wenn man einen Brenner benützt, dem nach *Marshal* oder *Allihn* die Luft von unten zugeführt wird. Man braucht dann den Brenner nur, wie in Fig. 255 dargestellt ist, mit Hilfe eines Drahtdreiecks über eine Schale zu setzen, in der die Gasentwicklung vor sich geht. Benützt man hierzu ein kleines Uhrglas, so kann man den Brenner ohne weiters darüber auf den Tisch stellen. Die in Fig. 256 wiedergegebene Spektrallampe besteht aus einem Brennrohr *R* aus Porzellan oder

Kaliglas, dem durch ein passend gebogenes Glasrohr *G* von unten (oder durch einen seitlichen Tubus) das Leuchtgas zugeführt wird. Eine Klemme *K* und eine einfache Feder *F* halten den Brenner in beliebiger Höhe fest, während die zu prüfende Flüssigkeit in einem passenden Schälchen darunter gesetzt wird. Dieser Brenner hat den Vorzug, daß er nicht durch Rost angegriffen wird und leicht in allen seinen Teilen zu reinigen ist.

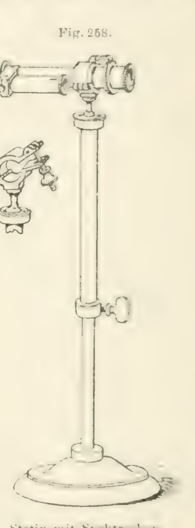
Den Sprühnebel der Salzlösung kann man auch von außen der Flamme zuführen, z. B. in der von *G. Lockemann* angegebenen Anordnung von Fig. 257. Die angesäuerte Salzlösung mit einigen Stückchen verkupferten Zinks bringt man in ein gewöhnliches Glühröhrchen *R* und dieses befestigt man mit Hilfe einer passend geformten Klammer *K*[1]) an dem schräg gestellten Bunsenbrenner. Statt der Klammer kann man auch einen breiten, doppelt durchbohrten Korkstopfen benützen. Das Glühröhrchen ist so an den Brenner anzusetzen, daß seine obere Kante etwas (ca. 1 *mm*) über die Brenneröffnung hinausragt, damit das Brennerrohr nicht durch verspritzte Säuretröpfchen angegriffen wird.

Fig. 257.



Anwendung eines Glührohrchens für die chemische Zerstäubung.

Fig. 258.



Stativ mit Spektroskop $^2/_9$ der wirklichen Größe.

Für die Spektralbeobachtung benützt man am vorteilhaftesten ein kleines Handspektroskop mit Skala und Vergleichsprisma[2]), welches man in ein mit Kugelgelenk versehenes, verstellbares Stativ[1]) einklemmt, wie es in Fig. 258 angegeben ist. Man muß das Spektroskop in der Höhe einstellen, daß man oberhalb des inneren Flammenkegels (welcher die grünen und blauen Kohlenstofflinien gibt) in die Flamme blickt. Die für die einzelnen Elemente charakteristischen Linien sind in der Spektraltafel wiedergegeben. Am ratsamsten ist es, zunächst die Spektra der einzelnen Metalle genau zu studieren und auch bei der analytischen Prüfung Vergleichslösungen bereit zu halten, deren Spektrum man durch das Vergleichsprisma unter Anwendung einer zweiten Spektrallampe (seitwärts rechtwinklig zur Spektroskopachse aufgestellt) betrachtet.

[1]) Zu beziehen von Mechaniker *G. Hildebrandt*, Leipzig, Bruderstraße 34.
[2]) Zu beziehen von *F. Schmidt & Haensch*, Berlin S. 42, Prinzessinnenstraße 16

Natriumsalze färben die nichtleuchtende Flamme intensiv gelb; in diesem Licht erscheinen Krystalle von Kaliumdichromat fahlgrau. Im Spektrum die gelbe *D*-Linie. **Kalium**salz gibt in reinem Zustande eine blauviolette Flamme, die leicht durch andere Flammenfärbungen (besonders Natrium) verdeckt wird. Durch Indigolösung oder ein gutes Kobaltglas betrachtet, erscheint die Kaliumflamme, auch bei Gegenwart anderer Salze karminrot. Im Spektrum ist besonders die fast am Ende des sichtbaren Teils liegende rote Linie charakteristisch; die am anderen Ende des Spektrums liegende blauviolette Linie ist schwer zu erkennen. Die **Lithium**flamme ist karminrot; im Spektrum liegt die rote Linie zwischen der Kalium- und der Natriumlinie.

Calciumsalze färben die Flamme orangerot; im Spektrum sind eine orangerote (zwischen Lithium- und Natriumlinie) und eine grüne Linie besonders charakteristisch; außerdem gibt es noch eine blaue Linie. **Strontium**salze geben eine rote Flammenfärbung; im Spektrum erscheint eine gelbe, mehrere rote und eine besonders charakteristische blaue Linie. Die Flammenfärbung der **Baryum**salze ist grün; im Spektrum ist außer gelben und roten Linien besonders eine Serie grüner Linien charakteristisch.

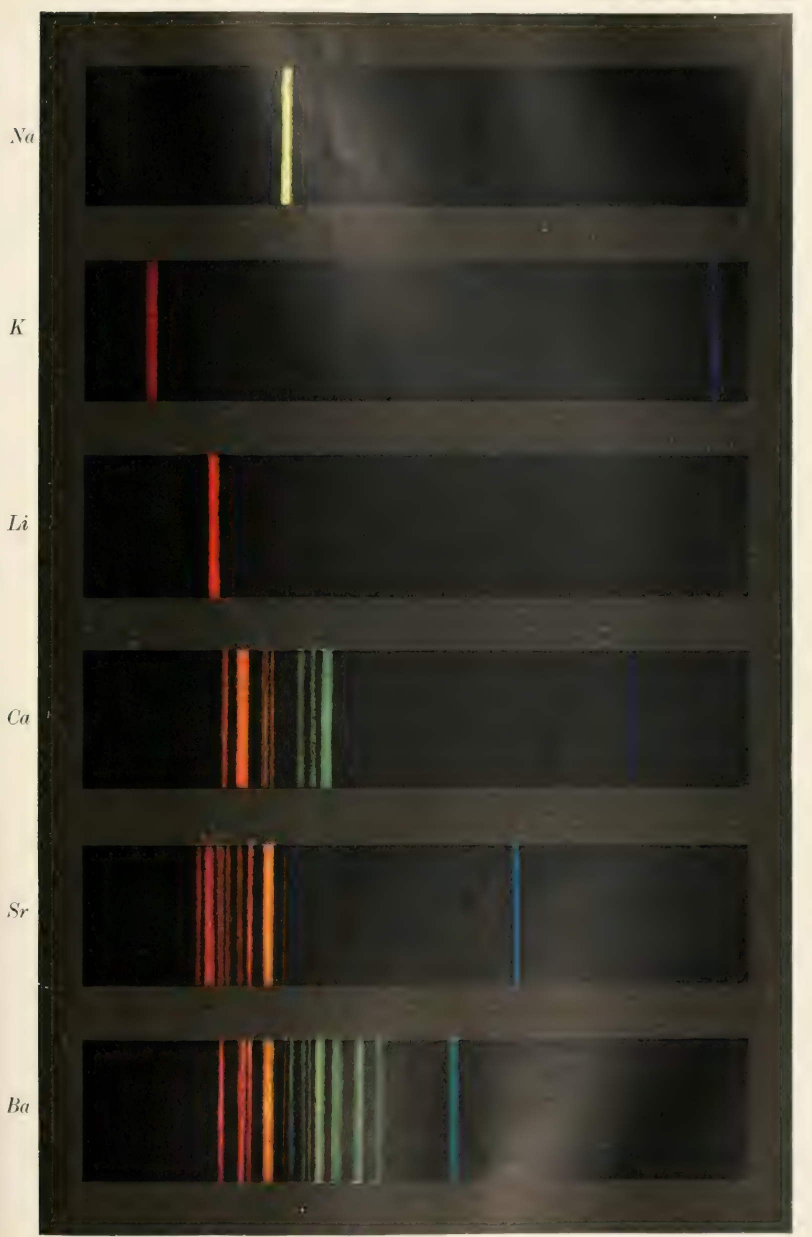
Stellt man die Spektralbeobachtungen im Dunkelzimmer an, so gewinnen sie dadurch an Schärfe. Aber auch im gewöhnlichen Arbeitsraum ist die Empfindlichkeit ziemlich groß, wenn man nur einen dunklen Hintergrund auswählt. Nach den Versuchen von *E. Beckmann* lassen sich auf diese Weise folgende Mengen noch bequem spektroskopisch erkennen.

3·0 *mg*	Kalium
0·1 „	Lithium
1·0 „	Calcium
2·0 „	Strontium
15·0 „	Baryum.

Die Natriumlinie erscheint ja immer im Spektroskop, da die in die Flamme fliegenden feinen Staubteilchen stets natriumhaltig sind und nach *Kirchhoff* und *Bunsen* schon $^1/_{3000000}$ *mg* Natriumsalz genügen, um eine für das Auge noch deutlich erkennbare gelbe Linie hervorzurufen. Diese dient zur Orientierung für die Lage der übrigen Spektrallinien.

Magnesiumverbindungen verbrennen zu weißem, nichtflüchtigem Oxyd und geben daher keine Flammenfärbung.

(Zu S. 392.) Ist bei der Analyse auch auf Schwermetalle Rücksicht zu nehmen, so muß der ganze Analysengang durchgemacht werden. Wenn auch einige der Metalle hierbei nur ausnahmsweise in Betracht kommen dürften, so sei doch der Übersichtlichkeit halber der chemische Nachweis aller, außer den selteneren Metallen, kurz besprochen. Eine qualitative Analyse kompliziert zusammengesetzter Stoffe in allen Einzelheiten sicher und zuverlässig auszuführen, erfordert allerdings ein erhebliches Maß von Übung und Erfahrung.



Verlag von Urban & Schwarzenberg. Berlin und Wien.

Druck von Gottlieb Gistel & Cie. in Wien.



Bei der Aschenanalyse wird es sich fast ausschließlich um den Nachweis einer sehr beschränkten Anzahl von Metallen handeln.

Analysengang zum Nachweis der basischen Aschenbestandteile.

Zunächst ist es ratsam, **Vorproben** mit einer Phosphorsalz- oder Boraxperle anzustellen. An einer Platindrahtöse von 2—3 *mm* Durchmesser schmilzt man etwas Phosphorsalz (Natriumammoniumphosphat = $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$) zunächst vorsichtig am Rande der Flamme, bis das Krystallwasser und das beim Übergang des Salzes in Natriummetaphosphat ($NaPO_3$) frei werdende Wasser und Ammoniak entwichen sind; dann allmählich stärker, sodaß sich in der Öse ein ruhiger Schmelzfluß bildet, der beim Abkühlen zu einer „Perle" erstarrt. Eine Boraxperle stellt man aus Borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) in entsprechender Weise her. Diese Salzperlen haben die Eigenschaft, in der Schmelzhitze gewisse Metallsalze mit charakteristischen Farben zu lösen (unter Bildung des betreffenden Phosphats oder Borats) oder durch Nichtlösen (Trübung, Ausscheidung) die Gegenwart bestimmter Stoffe anzuzeigen. Bei den Farbenreaktionen unterscheidet man das Verhalten in dem Oxydationsraum und dem Reduktionsraum der Flamme. Bei der nichtleuchtenden Bunsenflamme stellt der äußere Flammenmantel mit der von innen und außen reichlich zuströmenden Luft den Oxydationsraum dar; durch passende Einschränkung der Luftzufuhr (Regulierung der unteren Öffnungen) erhält man einen leuchtenden Zipfel des inneren Kegels, den man als Reduktionsraum für die Perlenprobe braucht.

Zur Ausführung der Proben tupft man mit der heißen Perle auf die gepulverte Substanz und erhitzt dann in der Flamme.

Die Perlenreaktionen seien der Übersichtlichkeit halber tabellarisch zusammengestellt:

Verhalten der Phosphorsalzperle:	im Oxydationsraum	im Reduktionsraum
rot	—	Kupfer (Cu_2O)
gelbrot	Nickel	Nickel
	Eisen (kalt: heller)	—
grün	Chrom	Chrom
	Kupfer (kalt: blau)	Eisen (fast farblos)
blau	Kupfer	—
	Kobalt	Kobalt
violett	Mangan	—
grau-trübe	—	einige Schwermetalle
weiß-trübe	Erdalkalien (bei viel Substanz)	
	Zinn usw.	
farblos durchsichtig mit fester Ausscheidung	Kieselskelett bei Silikaten.	

Die Boraxperle gibt dieselben Erscheinungen, nur daß bei Nickel die Reduktionsperle grau getrübt und daß Kieselsäure stärker gelöst

wird. Also ist zur Prüfung auf Silikate besonders die Phosphorsalzprobe zu empfehlen.

Für die qualitative Aschenanalyse benützt man natürlich nur einen kleinen Teil, um die Hauptmenge für die quantitativen Bestimmungen zurückzubehalten. Die Substanz wird in einer Reibschale möglichst fein zerrieben und dann gelöst. Zunächst versucht man die Substanz durch Erwärmen mit Wasser in Lösung zu bringen. Gelingt dieses nicht ganz, so setzt man Salpetersäure oder Salzsäure hinzu und erwärmt weiter. Die Anwendung von Königswasser (1 Teil konz. Salpetersäure + 3 Teile konz. Salzsäure) wird bei Aschenanalysen kaum in Frage kommen.

Sollte die Vorprobe in der Phosphorsalzprobe ein Kieselskelett ergeben haben, so muß die Kieselsäure zunächst abgeschieden werden. Das geschieht, indem man die Substanz mit Salzsäure in einer Schale auf dem Wasserbade wiederholt zur Trockne verdampft. Dadurch wird die Kieselsäure amorph abgeschieden. Der Rückstand wird mit etwas konzentrierter Salzsäure versetzt, nach einiger Zeit mit heißem Wasser aufgenommen und filtriert.

Für die Analyse kann man nun entweder den wässerigen Auszug und die Säurelösung des im Wasser unlöslichen Teiles getrennt voneinander benutzen oder gleich die gesamte Lösung. In beiden Fällen ist der Untersuchungsgang derselbe, nur ist bei der getrennten Untersuchung in den einzelnen Lösungen die Anwesenheit mancher Stoffe von vornherein ausgeschlossen. So würde man z. B. bei Gegenwart von Phosphorsäure oder Kohlensäure in der wässerigen Lösung nicht auf die Erdalkalien, andererseits nach vorherigem Ausziehen der Substanz mit Wasser in der Säurelösung nicht auf die Alkalien zu prüfen brauchen.

Für den folgenden Analysengang ist der Fall angenommen, daß alle Bestandteile in einer einheitlichen Säurelösung untersucht werden.

Als Säure ist am vorteilhaftesten verdünnte Salpetersäure zu verwenden. Bei Benutzung von Salzsäure würden natürlich (zu S. 392) Silber und Blei (dieses in der Kälte) als Chloride ungelöst bleiben.

Untersuchung der salpetersauren Lösung.

Gruppenfällungen.

Die Gruppenreaktionen werden jedesmal erst mit kleinen Proben der Lösungen angestellt und nur wenn wirklich Fällung erfolgt, mit der Hauptmenge.

I. Gruppe (Salzsäure).

Mit verdünnter Salzsäure entsteht ein weißer Niederschlag bei Gegenwart von Blei- und Silbersalzen. Mercurosalze kommen bei einer Glühasche nicht in Betracht, da sich alle Quecksilberverbindungen in der Hitze verflüchtigen. Eine besondere Prüfung der ursprünglichen Substanz auf Quecksilber ist weiter unten angegeben. Ist ein Chloridnieder-

schlag entstanden, so wird er zunächst mit kaltem Wasser ausgewaschen und dann mit heißem Wasser behandelt, bzw. direkt mit Wasser gekocht. **Blei** würde dabei in Lösung gehen und mit verdünnter Schwefelsäure als weißes Sulfat oder mit Kaliumchromat als gelbes Chromat ausfallen; auch scheidet sich das Bleichlorid selbst beim Abkühlen der wässerigen Lösung krystallinisch wieder ab. Die Bleiniederschläge sind alle (außer dem Sulfid) in Natronlauge löslich und werden durch Ansäuern mit Essigsäure wieder ausgeschieden.

Bleibt beim Behandeln mit heißem Wasser ein Teil des Chloridniederschlages ungelöst, so liegt **Silber** vor. Das Silberchlorid ist besonders dadurch charakterisiert, daß es in wenig Ammoniak löslich ist und auf Ansäuern mit Salpetersäure wieder ausfällt.

II. Gruppe (Schwefelwasserstoff).

In dem Filtrat der ersten Gruppe (bzw. der ursprünglichen sauren Lösung) entsteht beim Einleiten von Schwefelwasserstoff (längere Zeit in die erwärmte Lösung) ein Sulfidniederschlag bei Gegenwart von Blei, Wismut, Kupfer, Cadmium, Arsen, Antimon, Zinn. Blei würde hier natürlich nur noch ausfallen, wenn es durch Salzsäure in der ersten Gruppe nicht vollständig abgeschieden wäre. Außerdem käme in der zweiten Gruppe noch Quecksilber in Betracht, auf das man ja aber eine Probe der ursprünglichen Substanz vor dem Veraschen nach besonderem Verfahren prüfen muß (siehe weiter unten).

Der entstandene Sulfidniederschlag wird abfiltriert, das Filtrat nochmals mit Schwefelwasserstoff geprüft, bis keine Fällung mehr entsteht. Es ist vorteilhaft (besonders bei Arsen), die mit Schwefelwasserstoff gesättigte Lösung vor dem Filtrieren längere Zeit (vielleicht bis zum nächsten Tage) stehen zu lassen, damit sich das Sulfid vollständig abscheidet. Der Gesamtniederschlag wird nun mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser wiederholt ausgewaschen und dann (gleich auf dem Filter) mit einer erwärmten Lösung von Natrium- oder Kaliumpolysulfid behandelt. Die Alkalisulfide sind dem sonst gebräuchlichen Ammoniumsulfide vorzuziehen, da hier einerseits auf Quecksilber, dessen Sulfid durch die Alkalisulfide gelöst wird, keine Rücksicht genommen zu werden braucht und da andererseits Ammoniumsulfid etwa vorhandenes Kupfer zum Teil mitlösen und dadurch die Analyse komplizieren würde. Ist die Gegenwart von Kupfer ausgeschlossen, so kann man natürlich ebensogut Ammoniumpolysulfid verwenden.

Die Sulfide von Blei, Wismut, Kupfer und Cadmium würden bei dieser Behandlung ungelöst zurückbleiben. Diese werden dann in heißer, verdünnter Salpetersäure gelöst. In der abgekühlten Lösung würde verdünnte Schwefelsäure das **Blei** als weißes Sulfat ausfällen, das abfiltriert, sich durch seine Löslichkeit in Natronlauge und Wiederfällung beim Ansäuern noch näher charakterisieren läßt.

Im Filtrat fällt Ammoniak etwa vorhandenes **Wismut** als weißes Hydroxyd, dessen Lösung in möglichst wenig Salzsäure mit viel Wasser verdünnt einen Niederschlag oder eine Trübung von weißem basischen Salz gibt und mit alkalischer Natriumstannitlösung (Zinnchlorür mit überschüssiger Natronlauge) schwarzes, metallisches Wismut abscheidet.

Ist das ammoniakalische Filtrat farblos, so kann kein Kupfer zugegen sein. **Cadmium** würde aus dieser Lösung durch Schwefelwasserstoff als gelbes Sulfid gefällt werden, das sich vom Arsensulfid durch seine Unlöslichkeit im Ammoniumsulfid unterscheidet.

Würde die Lösung durch Zusatz von Ammoniak jedoch blau gefärbt, so ist **Kupfer** zugegen. Diese Blaufärbung ist noch in sehr großer Verdünnung zu erkennen. Zur weiteren Charakterisierung kann man auch noch eine andere ebenfalls sehr empfindliche Reaktion ausführen, indem man die mit Salzsäure oder Salpetersäure schwach angesäuerte Lösung mit Kaliumferrocyanid versetzt; dadurch wird rotbraunes Cupriferrocyanid gefällt, oder bei Anwesenheit von sehr wenig Kupfer statt des Niederschlages noch eine rote Färbung hervorgerufen. Die empfindlichste Reaktion auf Kupfer erhält man nach *Rud. Uhlenhuth* [1]) mit einer alkalischen Lösung von 1,2-Diamidoanthrachinon-3-sulfosäure, die auf folgende Weise bereitet wird: 0·5 *g* der genannten Sulfosäure werden in 500 cm^3 Wasser unter Zusatz von 40 cm^3 Natronlauge von 40° Bé (35% NaOH) gelöst. Setzt man diese Lösung zu der zu prüfenden (schwach alkalischen) Flüssigkeit, so tritt bei dem geringsten Kupfergehalt sofort eine Blaufärbung auf, die noch bei 0·0019 *mg* Cu in 1 cm^3 Lösung gut sichtbar sein soll. Die äußerste Grenze liegt bei 0·00019 *mg* Cu in 1 cm^3 (= 1·9 : 10,000.000). Die Reaktion scheint eindeutig zu sein, da andere Metallsalze eine solche Blaufärbung nicht geben.

Soll bei Gegenwart von Kupfer noch auf **Cadmium** geprüft werden, so wird die blaue ammoniakalische Lösung mit Kaliumcyanid versetzt, wodurch unter Komplexsalzbildung Entfärbung eintritt, und Schwefelwasserstoff eingeleitet. Cadmium würde dann als gelbes Sulfid ausfallen.

Die Alkalipolysulfidlösung des ursprünglichen Schwefelwasserstoffniederschlages kann die Sulfide von Arsen, Antimon und Zinn enthalten, welche dann beim Ansäuern mit verdünnter Salzsäure wieder ausfallen, abfiltriert und nachgewaschen werden. Der Niederschlag hat bei Anwesenheit von Arsen oder Zinn eine gelbe, bei Antimon eine orangerote Farbe.

Beim Erwärmen mit (möglichst konzentrierter) Ammoniumkarbonatlösung geht **Arsen** in Lösung und kann nach längerem Erwärmen mit Wasserstoffsuperoxydlösung (Oxydation zu Arsensäure) durch Zusatz von Magnesiamixtur als krystallinisches Magnesiumammoniumarseniat gefällt werden. Die Krystalle, deren Abscheidung

[1]) *Rudolf Uhlenhuth*, Eine neue Reaktion auf Kupfer. Chemiker-Zeitg. **34** (1910). 887.

durch Zusatz von Alkohol und durch Reiben der Glaswandung mit einem Glasstabe beschleunigt werden kann, erscheinen unter dem Mikroskop in denselben Formen wie das entsprechende Phosphat, nämlich meist als kleine Stäbchen, die scheren-, stern- oder büschelförmig zusammengelagert sind.

Sollte auf Zusatz von Magnesiamixtur auch nach längerer Zeit kein Niederschlag entstehen, so verdampft man die Lösung zur Trockne, nimmt den Rückstand mit etwas verdünnter Schwefelsäure auf und prüft im *Marsh*schen Apparat (siehe weiter unten). Bleibt auch diese Probe negativ, so kann die ursprüngliche Substanz trotzdem Arsen enthalten, welches dann vielleicht bei der Veraschung unter der reduzierenden Wirkung der verkohlenden organischen Stoffe ausgetrieben wurde.

Zur genauen Prüfung auf Arsen muß man daher einen Teil des ursprünglichen Objekts nach dem weiter unten beschriebenen Verfahren besonders untersuchen.

Ein beim Behandeln mit Ammoniumkarbonat ungelöst bleibender Rückstand wird mit wenig konzentrierter Salzsäure erhitzt und dadurch (außer etwa vorhandenem Schwefel) gelöst. Nach längerem Kochen zur Vertreibung des Schwefelwasserstoffs wird mit Wasser verdünnt und nach dem Abkühlen etwas metallisches Eisen (ein paar kleine Nägel oder etwas Eisendraht) hinzugesetzt. Etwa vorhandenes **Antimon** scheidet sich dann als schwarzer Metallschwamm auf dem Eisen ab, der vom Eisen entfernt und in möglichst wenig Königswasser gelöst die charakteristischen Reaktionen gibt: in einer mit Wasser verdünnten Probe der Lösung wird durch Schwefelwasserstoff das orangerote Antimonsulfid gefällt; eine andere Probe gibt mit sehr viel Wasser eine weiße Trübung oder Fällung von basischem Antimonsalz, in Weinsäure löslich (Unterschied von Wismut).

Sehr kleine Mengen von Antimon werden am sichersten im *Marsh*schen Apparat erkannt. Der Antimonspiegel setzt sich meist auch schon vor der erhitzten Stelle des Glührohres ab; der auf Porzellan abgeschiedene Antimonfleck ist zum Unterschied von Arsen von einer mattschwarzen Farbe und in Natriumhypochloritlösung nicht löslich.

Die von Eisen und Antimon abgegossene oder abfiltrierte Lösung kann **Zinn,** durch das Eisen zu Stannochlorid reduziert, enthalten. Sie gibt dann mit Schwefelwasserstoff einen braunen Niederschlag von Stannosulfid (Zinnsulfür), mit Mercurichlorid einen weißen Niederschlag von Mercurochlorid (Quecksilberchlorür), bzw. einen grauen Niederschlag von metallischem Quecksilber.

Die Trennung des Antimons von Zinn und Arsen kann auch auf folgende Weise ausgeführt werden: die durch Behandeln der Sulfide mit Alkalipolysulfid erhaltene Lösung wird in einer Schale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, der Rückstand wiederholt auf dem Wasserbade mit konzentrierter oder rauchender Salpetersäure behandelt, schließlich in Wasser gelöst und mit etwas reiner Soda und reinem Natrium-

nitrat zur Trockne verdampft. Dieses Salzgemisch wird allmählich in etwas schmelzendes Natriumnitrat (in einem Porzellantiegel) eingetragen, wodurch Antimon, Zinn und Arsen in die Natriumsalze ihrer Säuren übergeführt werden. Beim Behandeln der abgekühlten Schmelze mit Wasser gehen Zinn und Arsen in Lösung, während Antimon als Natriumantimoniat ungelöst bleibt. Nach dem Filtrieren werden die einzelnen Metalle in der oben beschriebenen Weise näher charakterisiert.

III. Gruppe (Ammoniak).

Das Filtrat der zweiten Gruppe wird gekocht, bis der Schwefelwasserstoff vertrieben ist, und mit etwas verdünnter Salpetersäure weiter erhitzt, damit etwa vorhandenes Eisen von Ferro- (durch H_2S reduziert) zu Ferrisalz und die letzten Spuren Schwefelwasserstoff oxydiert werden. Den etwa abgeschiedenen Schwefel filtriert man ab. Auch wenn kein Schwefelwasserstoff eingeleitet wurde, muß man zunächst mit Salpetersäure oxydieren. Die Lösung wird mit Ammoniumchlorid (um eventuell Mangan und Magnesium in Lösung zu halten) und Ammoniak in geringem Überschuß versetzt, gelinde erwärmt und filtriert. Der Niederschlag, der mit ammoniakalischem Wasser nachgewaschen wird, kann enthalten: Eisen (Mangan), Chrom, Aluminium und bei Gegenwart von Phosphorsäure auch die Phosphate von Mangan, Magnesium, Calcium (Strontium, Baryum). Auch bei Abwesenheit von Phosphorsäure wird Mangan mit dem Eisen zusammen schon mehr oder weniger gefällt.

Der Niederschlag wird in verdünnter Salzsäure (auf dem Filter) gelöst und diese Lösung in überschüssige Natronlauge gegeben. Dabei scheidet sich Eisen (eventuell mit etwas Chrom und Mangan) als braunes Hydroxyd oder als helles Phosphat eventuell neben den Phosphaten von Mangan, Magnesium und den Erdalkalien ab, während Chrom und Aluminium in Lösung bleiben. Man prüft nun zunächst den Niederschlag auf Phosphorsäure, indem man eine Probe in Salpetersäure löst und mit Ammoniummolybdatlösung (und konzentrierter Salpetersäure) gelinde erwärmt. Ein gelber Niederschlag oder (bei sehr geringen Mengen) eine intensive Gelbfärbung zeigt die Gegenwart von Phosphaten an. Je nach dem Ausfall dieser Reaktion muß man zur weiteren Prüfung verschieden verfahren.

Bei **Abwesenheit von Phosphorsäure** kann die Hauptmenge des (braunen) Niederschlages nur aus **Eisen**hydroxyd bestehen, dem eventuell etwas Chrom und Mangan beigemischt sein könnten. Eine Probe des Niederschlages in Salzsäure gelöst gibt die charakteristischen Eisenreaktionen: mit Kaliumferrocyanid Berlinerblau, mit Kaliumrhodanid dunkelrote Färbung (siehe oben S. 1050—1051).

Zur Prüfung auf **Chrom** wird eine andere Probe des Niederschlages mit etwas Soda und Salpeter geschmolzen (am einfachsten auf einem Platinblech oder auch in einem kleinen Porzellantiegel): entsteht beim Aufnehmen der Schmelze mit Wasser eine gelbe Lösung (filtrieren!), so ist Chrom zugegen; die mit Essigsäure angesäuerte Lösung gibt mit Bary-

umchlorid und mit Bleiacetat gelbe Fällungen, mit einigen Tropfen Wasserstoffsuperoxydlösung eine Blaufärbung, die beim Schütteln mit Äther in diesen übergeht, aber bald wieder verschwindet.

Um auf **Mangan** zu prüfen, erhitzt man eine dritte Probe des Niederschlages mit etwas Bleisuperoxyd und konzentrierter Salpetersäure. Entsteht eine rotviolette Lösung, die besonders gut zu erkennen ist, wenn sich das Blei abgesetzt hat und vielleicht noch mit etwas Wasser verdünnt wurde, so ist Mangan zugegen; durch Wasserstoffsuperoxyd wird die Lösung unter Sauerstoffentwicklung entfärbt.

Das Filtrat des mit Natronlauge erhaltenen Niederschlags kann noch Chrom und Aluminium enthalten. Eine grüne Färbung zeigt die Gegenwart von **Chrom** an, welches nach dem Verdünnen mit Wasser beim Kochen als grünes Chromhydroxyd ausfällt. Eine Probe des Niederschlags gibt beim Kochen mit Natronlauge und Wasserstoffsuperoxyd eine gelbe Lösung, mit der man die vorhin erwähnten charakteristischen Chromatreaktionen ausführt.

Im Filtrat vom Chromniederschlage (oder bei Abwesenheit von Chrom im ursprünglichen) prüft man auf **Aluminium**, indem man mit (ungefähr gleichem Volumen) Ammoniumchlorid versetzt und erwärmt; Aluminium scheidet sich dann als weißes Hydroxyd aus, welches beim Glühen mit etwas Kobaltnitrat (auf dem Platinblech oder vor dem Lötrohr auf Holzkohle) das charakteristische vergißmeinnichtfarbige Blau (Thénards-Blau) gibt.

Bei **Anwesenheit von Phosphorsäure** in dem mit Natronlauge erhaltenen Niederschlage muß diese zunächst entfernt werden, damit man auf die Basen prüfen kann. Der Niederschlag wird in konzentrierter Salpetersäure gelöst und mit feingeschnittener Zinnfolie (Stanniol) in einer Porzellanschale (unter dem Abzuge) eingedampft, eventuell unter wiederholtem Zufügen von konzentrierter Salpetersäure, bis ein teigartiger Rückstand bleibt. Dieser enthält (außer Nitraten) die Phosphorsäure als unlösliches Zinnphosphat und das überschüssige Zinn als Metazinnsäure (H_2SnO_3). Er wird mit kaltem und dann mit heißem Wasser ausgelaugt, um die Erdalkalinitrate zu extrahieren, und filtriert. Sollte das Filtrat noch Phosphate enthalten (Prüfung mit Ammoniummolybdat), dann müßte die Behandlung mit Zinn und Salpetersäure wiederholt werden. Tritt auf Zusatz des Molybdats etwa Blaufärbung ein (durch Reduktion der Molybdänsäure), so ist das ein Zeichen, daß etwas Zinn in Lösung gegangen ist. Dieses muß durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt werden; die filtrierte Lösung ist dann zunächst wieder mit Salpetersäure zu kochen.

Die auf diese Weise von Phosphorsäure befreite Lösung wird mit Ammoniumchlorid und Ammoniak in geringem Überschuß versetzt, gelinde erwärmt, und der entstandene Niederschlag wird filtriert. Dieser wird in der oben beschriebenen Weise (bei Abwesenheit von Phosphorsäure) auf Eisen, Chrom und Mangan geprüft. Das ammoniakalische Filtrat untersucht man auf Mangan, die Erdalkalien und Magnesium, wie weiter unten angegeben ist (IV., V., VI. Gruppe).

IV. Gruppe (Ammoniumsulfid).

Das ammoniakalische Filtrat vom Niederschlag der dritten Gruppe wird mit Ammoniumsulfid (nicht Polysulfid) in möglichst geringem Überschuß versetzt. Dabei können sich die Sulfide ausscheiden von: Zink, Mangan, Kobalt, Nickel. Die Farbe des Niederschlages gibt schon darüber Auskunft, ob etwa Zink allein vorliegt (weiß), ob auf Zink und Mangan (rötlich) oder auf alle vier Metalle (schwarz) zu prüfen ist. Beim Behandeln des Niederschlages mit kalter verdünnter Salzsäure werden Zink und Mangan gelöst. Die eventuell vom unlöslichen schwarzen Rückstand filtrierte Lösung wird zunächst gekocht, bis aller Schwefelwasserstoff ausgetrieben ist und dann nach dem Abkühlen in überschüssige Natronlauge eingegossen. Dabei fällt Mangan als Hydroxydul aus, während **Zink** als Natriumzinkat in Lösung bleibt. In dieser (filtrierten) Lösung entsteht beim Einleiten von Schwefelwasserstoff ein weißer Niederschlag von Zinksulfid (außer Germaniumsulfid das einzige weiße Sulfid). Tränkt man etwas Fließpapier mit der Zinklösung und gleichzeitig mit etwas Kobaltnitratlösung, so erhält man nach dem Trocknen beim Verbrennen eine grüne Asche (Rinmanns-Grün).

Der in überschüssiger Natronlauge entstandene Niederschlag von **Mangan**hydroxydul färbt sich an der Luft bald dunkler. Er gibt die oben angegebenen charakteristischen Reaktionen.

War der Sulfidniederschlag schwarz und blieb beim Behandeln mit verdünnter Salzsäure ein schwarzer Rückstand, so liegt Nickel oder Kobalt vor. Man löst in Königswasser, dampft die überschüssige Säure ab, verdünnt mit Wasser und prüft in zwei getrennten Teilen. Einen Teil macht man mit Natronlauge schwach alkalisch, säuert dann mit Essigsäure an und fügt ziemlich viel Kaliumnitritlösung hinzu. **Kobalt** würde sich allmählich als gelber, kristallinischer Niederschlag von Kaliumkobaltnitrit ausscheiden. Außerdem ist die Blaufärbung der Phosphorsalzperle für Kobalt charakteristisch (s. oben S. 1055).

Einen anderen Teil der Lösung neutralisiert man mit Natronlauge und versetzt dann mit ziemlich viel Kaliumcyanidlösung. Beim Erwärmen mit überschüssigem Bromwasser würde sich **Nickel** als schwarzes Hydroxyd ausscheiden.

Die Metalle der vierten analytischen Gruppe werden nur sehr selten in Aschen organischer Stoffe vorkommen. In erster Linie würde wohl Mangan zu berücksichtigen sein, Zink nur in toxikologischen Fällen oder bei absichtlichen Zusätzen bzw. bei toxikologischen Tierversuchen. Aber Kobalt und Nickel sind in geringen Spuren sehr weit verbreitet. So konnte *K. Kraut* [1]) mit Hilfe des von *L. Tschugaeff* [2]) angegebenen empfind-

---

[1]) *K. Kraut,* Über die Verbreitung des Nickels und Kobalts in der Natur. Zeitschr. f. angew. Chemie. **19** (1906). 1793.

[2]) *L. Tschugaeff,* Über ein neues, empfindliches Reagens auf Nickel. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **38** (1905). 2520.

lichen Nickelreagens α-Dimethylglyoxim ($CH_3.C(NOH).C(NOH).CH_3$), das sich auch zum Nachweis kleiner Spuren von Kobalt eignet, in Aschenproben von Torf und Braunkohlen und in anderen Naturprodukten sowohl Nickel wie auch Kobalt nachweisen.

Nach *Kraut* verfährt man in der Weise, daß man etwa 1 *g* Asche mit 5 *cm*³ Salzsäure von etwa 25%, 5 Minuten kocht, die Lösung auf 100 *cm*³ verdünnt, mit 10 *cm*³ Ammoniak übersättigt und filtriert. Wird das Filtrat mit 10 *cm*³ kaltgesättigter Dimethylglyoximlösung (weniger als 1 *g* im Liter enthaltend) fast bis zur Trockne eingedampft, so bleibt bei Gegenwart von **Nickel** ein an einzelnen Punkten oder durch die ganze Masse rotgefärbter Rückstand. Bei Abwesenheit fremder Substanzen ist auf diese Weise noch 0·001 *mg* Ni deutlich zu erkennen. Bei größeren Mengen scheidet sich in ammoniakalischer Lösung auf Zusatz des Glyoxims das Nickelglyoximin in roten Nadeln aus. Auf **Kobalt** prüft man, indem man der abfiltrierten ammoniakalischen Lösung Ammoniumsulfid hinzufügt; bei Gegenwart von Kobalt entsteht dann eine blauviolette bis tiefrote Farbe. Auch diese Reaktion ist sehr empfindlich.

V. Gruppe (Ammoniumkarbonat).

Das Filtrat vom Niederschlag der vierten Gruppe wird zur Entfernung des Ammoniumsulfids mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert, einige Zeit gekocht, bis sich der ausgeschiedene Schwefel zusammengeballt hat, und dann filtriert. Das Filtrat wird mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht (war der Zusatz von Ammoniumsulfid nicht nötig, so benutzt man natürlich gleich das ammoniakalische Filtrat der dritten Gruppe), mit Ammoniumkarbonatlösung versetzt und einige Zeit erwärmt. Ein entstehender Niederschlag, der mit Wasser ausgewaschen wird, kann die Karbonate von Baryum, Strontium, Calcium enthalten.

Es wird sich empfehlen, zunächst eine Probe des Niederschlages in verdünnter Salzsäure gelöst spektralanalytisch zu untersuchen, wie das oben geschildert ist. Da geringe Mengen Baryum, besonders neben anderen Elementen, spektroskopisch schwer zu erkennen sind, so muß man auf dieses Element in allen Fällen noch einmal in essigsaurer Lösung (bzw. nach Zusatz von Natriumacetat) mit Chromatlösung prüfen.

Zum chemischen Nachweis der einzelnen Erdalkalien löst man die Hauptmenge des Niederschlages in heißer verdünnter Essigsäure. Gibt nun eine Probe dieser Lösung mit Kaliumdichromatlösung einen gelben Niederschlag, so liegt **Baryum** vor und es wird die gesamte Lösung mit Kaliumdichromat und Natriumacetat einige Zeit erwärmt, der Niederschlag abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Eine Probe des gelben Niederschlages in Salzsäure gelöst gibt mit verdünnter Schwefelsäure die für Baryum charakteristische, in Säuren unlösliche Fällung von Baryumsulfat.

In dem gelben Filtrate werden durch Erwärmen mit Ammoniak und Ammoniumkarbonat Strontium und Calcium gefällt, wenn die spek-

troskopische Prüfung deren Anwesenheit verriet oder eine Probe des Filtrats die Karbonatfällung gab. Der Niederschlag wird nach dem Filtrieren und Auswaschen in wenig Essigsäure gelöst und in zwei getrennten Proben untersucht: Eine Probe dieser Lösung (oder bei Abwesenheit von Baryum eine Probe der essigsauren Lösung vom ursprünglichen Karbonatniederschlag) versetzt man mit Gypswasser: **Strontium** scheidet sich dann allmählich als Sulfat ab. Ist dieses der Fall, so versetzt man die andere Probe der Lösung in der Wärme mit verdünnter Schwefelsäure, filtriert das Strontiumsulfat nach einiger Zeit ab und fügt zu dem Filtrat Ammoniak und Ammoniumoxalat. Dadurch wird **Calcium** als fein krystallinisches Oxalat gefällt, das in Essigsäure unlöslich ist. Calcium läßt sich auch in einer Lösung neben Baryum und Strontium nachweisen, indem man die Lösung mit Ammoniak alkalisch macht und dann mit einer gesättigten Lösung von Kaliumferrocyanid versetzt. Calcium fällt dann allmählich als weißes krystallinisches Calciumferrocyanid aus, während Baryum und Strontium eine derartige Reaktion nicht geben.

VI. Gruppe.

Das Filtrat der fünften Gruppe kann außer den aus den Gruppenreagenzien stammenden Ammonsalzen noch Magnesium, Kalium, Natrium und Lithium enthalten.

Eine Probe der ammoniakalischen Lösung versetzt man mit Natriumphosphat; entsteht (besonders nach einigem Reiben der Glaswandung mit dem Glasstabe) ein krystallinischer Niederschlag, der unter dem Mikroskop die charakteristischen Krystallformen zeigt (mit einer Kontrollfällung von Magnesium vergleichen!), so ist **Magnesium** vorhanden.

Auf die **Alkalien** wird am besten in der oben beschriebenen Weise spektralanalytisch geprüft. Zu diesem Zweck ist die Lösung, wenn sie sehr voluminös geworden war, zunächst einzudampfen, der Rückstand zum Vertreiben der Ammonsalze gelinde zu erhitzen und dann in Wasser oder verdünnter Salzsäure zu lösen.

Nach Vertreibung der Ammonsalze kann man auf **Kalium** in salzsaurer Lösung mit Platinchlorid prüfen, das mit Kalium- (wie mit Ammonium-) Salzen einen gelben krystallinischen Niederschlag von Kaliumplatinchlorid gibt.

Außerdem fällt Weinsäure und Natriumacetat farbloses krystallinisches Kaliumbitartrat.

II. Saure Bestandteile.

Zu S. 400.

Für die Prüfung auf die sauren Bestandteile läßt sich, wenn die Asche völlig in Wasser löslich ist, ohne weiters die wässerige Lösung benutzen; für die meisten hier in Betracht kommenden Reaktionen ist auch eine Lösung in verdünnter Salpetersäure brauchbar. Will man eine für alle Reaktionen brauchbare Lösung haben, kocht man die Asche, falls

sie selber in Wasser nicht völlig löslich ist, einige Zeit mit Natriumcarbonatlösung und filtriert. Die sauren Bestandteile sind dann alle als Natriumsalze in der Lösung und werden darin nach Ansäuern mit Essigsäure oder Salpetersäure und Vertreiben der Kohlensäure durch Erhitzen nachgewiesen.

Hier soll nur noch einmal der Nachweis einiger Säuren kurz besprochen werden. Für **Chloride** ist besonders charakteristisch, daß der weiße, käsige Silberniederschlag in Ammoniak sehr leicht löslich ist und beim Ansäuern mit Salpetersäure wieder erscheint. Ist der Silberniederschlag in salpetersaurer Lösung nicht rein weiß (gelblich) und in Ammoniak schwerer oder teilweise unlöslich, so liegen noch **Bromide** und **Jodide** vor. Diese werden in kleinen Mengen am sichersten dadurch erkannt, daß man die Halogene in Freiheit setzt und mit Chloroform ausschüttelt: dabei löst sich Brom mit brauner, Jod mit violetter Farbe.

Zu S. 401. Durch Chlorwasser werden beide frei gemacht, und es ist schwer, auf diese Weise wenig Jod neben Brom zu erkennen. Setzt man vorsichtig Chlorwasser hinzu, so erscheint im Chloroform zunächst zwar nur die violette Jodfarbe; sie verschwindet jedoch mit überschüssigem Chlorwasser sofort (unter Bildung von fast farblosem Jodtrichlorid), um der braunen Bromfarbe Platz zu machen.

Aber man hat mehrere Reagenzien, die nur Jod in Freiheit setzen, so daß man mit deren Hilfe auch die kleinste Jodmenge leicht erkennen kann. Derartige Reagenzien sind: Wasserstoffsuperoxyd, Kaliumbichromat, Kaliumnitrit, die man tropfenweise zu der sauren Lösung hinzusetzt. Auch eisenchloridhaltige Salzsäure (*Obermayer*sches Reagens = 4 *g* $FeCl_3$ in 1 *l* rauchender Salzsäure) läßt sich zu diesem Zweck verwenden. Zur weiteren Prüfung auf Brom fügt man dann Chlorwasser hinzu.

Zu S. 401. Zum Nachweis von **Fluor** verfährt man nach *G. Tammann*[1]) in der Weise, daß man die Substanz mit etwas Quarzpulver, innig gemengt, in einen kleinen Ballon mit dreifach durchbohrtem Stopfen bringt, durch einen Scheidetrichter konzentrierte Schwefelsäure hinzulaufen läßt und erhitzt. Ein Strom trockner Luft durch ein nach unten führendes Rohr nimmt das etwa gebildete Siliciumfluorid durch eine in der dritten Korkbohrung steckende enge, zweifach gebogene Röhre mit in ein Gefäß mit Wasser. Dicht über dem benetzten Teile der Röhre wird das Gas durch die Feuchtigkeit zersetzt und scheidet gallertartige weiße Kieselsäure an der Röhrenwandung ab. So ist noch 0·1 *mg* Fluor deutlich nachweisbar.

Zu S. 401. Die Bildung von Siliciumfluorid kann man auch zum Nachweis von **Kieselsäure** benutzen. Man bringt den beim mehrfachen Abdampfen mit Salzsäure unlöslich bleibenden Rückstand mit etwas Kalium- oder Calciumfluorid zunächst in einen Platintiegel, gießt konzentrierte

[1]) *G. Tammann*, Über das Vorkommen des Fluors in Organismen. Zeitschrift f. physiolog. Chemie. **12** (1888). 322.

Schwefelsäure hinzu und erhitzt gelinde, während man über dem Tiegel ein Stück Glas (Uhrglas oder dgl.) mit einem oder einigen Tropfen Wasser hält. Die Kieselsäure scheidet sich dann in dem Wassertropfen als weiße Trübung ab.

Zur Prüfung auf **Borsäure** taucht man in die salzsaure Lösung einen Streifen gelben Curcumapapiers. Dieser nimmt besonders beim Trocknen eine braunrote Färbung an, die beim Betupfen mit Ammoniak in Blau übergeht.

Eine weitere charakteristische Borsäurereaktion ist die Grünfärbung der Flamme durch flüchtige Borverbindungen. Man mischt die Substanz mit Methylalkohol und konzentrierter Schwefelsäure in einem Reagenzglase und erhitzt vorsichtig: die entweichenden Dämpfe werden entzündet und geben (bei Gegenwart des flüchtigen Borsäureesters $B(OCH_3)_3$) eine grüngesäumte Flamme. Am besten läßt sich dieser Versuch mit Hilfe einer *Beckmann*schen Spektrallampe ausführen (siehe oben), indem man das Gemisch mit Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure in den gläsernen Zerstäuber bringt. Der Luftstrom führt die Borsäureesterdämpfe mit in die Flamme, welche dann im ganzen grün gefärbt wird.

Im Anschluß hieran sei noch der Nachweis von Quecksilber und Arsen besprochen, für die besondere Prüfungsmethoden erforderlich sind.

Nachweis von Quecksilber.

Da sich die Quecksilberverbindungen beim trocknen Erhitzen verflüchtigen, so ist die Glühasche zur Prüfung auf Quecksilber ungeeignet und man muß dazu einen besonderen Teil der ursprünglichen Substanz verwenden. Um das Quecksilber eventuell aus komplexorganischen Verbindungen erst frei zu machen, ist es notwendig, die organische Substanz in geeigneter Weise auf nassem Wege zu zerstören. Das geschieht am einfachsten nach dem Verfahren von *R. Fresenius* und *L. v. Babo*[1]) durch Behandeln mit Salzsäure und Kaliumchlorat. Man versetzt die Flüssigkeit oder, falls es sich um Fleisch u. dgl. handelt, die zerkleinerte und mit Wasser angerührte Substanz in einem Erlenmeyerkolben mit konzentrierter Salzsäure, fügt etwas Kaliumchlorat hinzu und erhitzt auf dem Wasserbade. Das weitere Hinzufügen von Kaliumchlorat geschieht am bequemsten in der Weise, daß man eine gesättigte wässerige Lösung (ca. 5% $KClO_3$) aus einem Tropftrichter allmählich hinzutropfen läßt. Den Tropftrichter kann man nebst einem Steigrohr in einem doppelt durchbohrten Stopfen auf den Kolben aufsetzen oder in einem einfach durchbohrten Stopfen auf einen Kolben mit seitlichem Ansatz, der dann das Steigrohr aufnimmt.

Den Zulauf der Kaliumchloratlösung regelt man so, daß dauernd möglichst alles Chlor in dem Zerstörungsgemisch verbraucht wird und

[1]) *R. Fresenius* und *L. v. Babo*, Über ein neues, unter allen Umständen sicheres Verfahren zur Ausmittlung und quantitativen Bestimmung des Arsens bei Vergiftungsfällen. *Liebigs* Annalen. **49** (1844). 308.

nichts oder wenig entweicht. Das naszierende Chlor löst die organischen Verbindungen auf und führt allmählich alles oder den größten Teil der Substanz in eine gelbliche Lösung über. Nötigenfalls muß noch etwas Salzsäure nachgefügt werden. Zum Schluß treibt man durch längeres Erhitzen und eventuell durch Einleiten von Kohlensäure das überschüssige Chlor aus und filtriert von nicht gelösten Teilen ab.

In dieser Lösung kann man nun das **Quecksilber** wie andere Schwermetalle durch Einleiten von Schwefelwasserstoff fällen. Der schwarze Mercurisulfidniederschlag, der abfiltriert und mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser ausgewaschen wird (mit reinem, kaltem Wasser geht er leicht kolloidal in Lösung), ist in verdünnter Salpetersäure auch beim Erwärmen unlöslich, löst sich aber in Königswasser. Diese Lösung (bei Verwendung größerer Säuremengen wird der Überschuß erst wieder abgedampft) mit Wasser verdünnt gibt die charakteristischen Quecksilberreaktionen:

In einer Probe fällt Zinnchlorürlösung weißes Mercurochlorid oder graues Quecksilber.

Ein Stück Blech oder Draht aus Kupfer oder Messing überzieht sich in der Lösung mit grauem metallischen Quecksilber, welches beim Reiben mit etwas Fließpapier oder Baumwolle spiegelblank wird. Rollt man das getrocknete Blech oder den Draht zusammen und erhitzt das verquickte Metall vorsichtig in einem Glühröhrchen, so entweicht das Quecksilber und setzt sich in dem kälteren Teil des Röhrchens als grauer Beschlag ab. Unter der Lupe oder dem Mikroskop kann man die einzelnen Quecksilberkügelchen erkennen. Bringt man auf den Boden des Glühröhrchens zunächst ein Stückchen Jod und dann darüber das verquickte Metall, so kann man durch gelindes Erwärmen (am besten über der kleinen Zündflamme eines Bunsenbrenners) das Jod verdampfen und durch Einwirkung der Joddämpfe auf das Quecksilber Quecksilberjodid bilden, welches dann beim stärkeren Erhitzen sublimiert und sich an der kühleren Glaswandung als gelber, allmählich rot werdender Beschlag ansetzt.

Man braucht auch das Quecksilber nicht erst mit Schwefelwasserstoff auszufällen, sondern kann die Zerstörungslösung gleich mit Kupfer oder Messing in der angegebenen Weise prüfen: indem man (nach völligem Austreiben des Chlors) die Lösung mit dem Metall 1—2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt.

Bei Harn kann man auch meistens das Behandeln mit Salzsäure und Kaliumchlorat unterlassen, indem man nur mit Salzsäure versetzt und dann die Prüfung ausführt. Enthält der Harn sehr wenig Quecksilber, so verfährt man nach *A. Almén*[1]) am besten in der Weise, daß man nach Zusatz von Natronlauge und Traubenzucker einige Zeit kocht. Dadurch wird das Quecksilber reduziert und von den sich ausscheidenden

[1]) *A. Almén*, Eine Methode zum Nachweis von minimalen Mengen Quecksilber im Harn und in Gemengen von organischen Substanzen. Svenska Läkaresällskapets förhandlingar. 1885. 142; Referat *Malys* Jahresberichte der Tierchemie 1886. 221.

Phosphaten beim Abkühlen mit niedergerissen. Nach vollständigem Absitzen gießt man die Flüssigkeit vorsichtig ab, filtriert den Rest und löst den Niederschlag in heißer Salzsäure (unter Zusatz von etwas Salpetersäure). In dieser Lösung wird dann das Quecksilber ganz ebenso nachgewiesen, wie oben angegeben. (Empfindlichkeit: 1 Teil Quecksilber in 10,000.000 Teilen Harn oder Milch.)

Nachweis von Arsen.

Wie für die Prüfung auf Quecksilber benutzt man auch für die Prüfung auf Arsen am vorteilhaftesten einen Teil der ursprünglichen organischen Substanz, da bei der Veraschung, wenn diese ohne Zusatz von Oxydationsmitteln (Ammonnitrat usw.) ausgeführt wird, das Arsen als flüchtiges Trioxyd teilweise oder ganz entweicht.

Die einfachste Methode ist der biologische Arsennachweis nach *R. Gosio* [1]). Dieser besteht darin, daß man einen besonderen Schimmelpilz, den Penicillium brevicaule, der besonders gut auf feuchten Brotkrumen gedeiht, auf der zu prüfenden, mit Wasser und Brot gemischten, sterilisierten Substanz ansiedelt. Harn läßt man z. B. direkt durch trockenes Brot aufsaugen. Bei Anwesenheit von Arsen wird dann durch die biologische Tätigkeit des Schimmelpilzes ein giftiges Gas von knoblauchartigem Geruch (organische Arsenverbindung, wahrscheinlich Diäthylarsin $(C_2H_5)_2AsH$ [2]) entwickelt. In günstigen Fällen soll sich noch 0·001 *mg* As_2O_3 durch einen deutlichen Geruch (nach zwei Tagen) erkennbar machen; in Wirklichkeit scheint die Methode aber nicht so empfindlich zu sein. Sie bietet auch sonst nicht die objektive Sicherheit wie andere chemische Reaktionen. Ferner ist zu berücksichtigen, daß der Pilz Penicillium brevicaule zwar nicht mit schwefel-, phosphor-, antimon-, wismuthaltigen Verbindungen, wohl aber mit Selen- und Tellurverbindungen Gase von ähnlichem, knoblauchartigem Geruch entwickelt.

Diese biologische Nachweismethode hat den großen Vorzug, daß man die organische Substanz ohne weitere chemische Eingriffe (ohne „Zerstörung") der Prüfung unterwerfen kann; doch ist sie aus den angeführten Gründen nur mit besonderer Vorsicht anzuwenden.

---

[1]) *R. Gosio,* Zur Frage, wodurch die Giftigkeit arsenhaltiger Tapeten bedingt wird. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **30** (1897). 1024. Weitere Arbeiten hierüber: *F. Abba,* Über die Feinheit der biologischen Methode beim Nachweis des Arseniks. Zentralbl. f. Bakter. u. Parasitenk. II. **4** (1898). 806; *W. Scholtz,* Über den Nachweis von Arsen auf biologischem Wege in den Hautschuppen, Haaren, Schweiß und Urin. Berl. klin. Wochenschr. **36** (1899). 913; *R. Abel* und *P. Buttenberg,* Über die Einwirkung von Schimmelpilzen auf Arsen und seine Verbindungen. Der Nachweis von Arsen auf biologischem Wege. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **32** (1899) 449; *Marpmann,* Über die biochemische Arsenreaktion. Pharmaz. Zentralh. **41** (1900) 666; *B. Galli-Valerio* und *C. Strzyzowski,* Über den biologischen Arsennachweis. Pharm. Post. **33** (1900). 637, 649.

[2]) *P. Biginelli,* Zusammensetzung und chemische Konstitution des arsenikhaltigen Gases der Tapeten. Atti R. Accad. dei Lincei Roma (5.) **9** (1900). II. 210 und 242; Referat: Chem. Zentralbl. 1900. II. 1067 u. 1100.

Zur Scheidung des Arsens von anderen Stoffen kann man sich in vielen Fällen des ursprünglich von *Schneider* und von *Fyfe* angegebenen Destillierverfahrens bedienen, welches auf der großen Flüchtigkeit des Arsenchlorürs beruht. Dieses Verfahren ist dann durch *E. Fischer*[1]) auch für Arsensäure brauchbar gemacht, indem er Eisenchlorür als Reduktionsmittel verwendete, und von verschiedenen anderen Forschern[2]) weiterhin modifiziert. Die Substanz wird mit starker Salzsäure und etwas Eisenchlorür (man kann natürlich auch ein anderes Ferrosalz, z. B. Ferrosulfat verwenden) in einem Destillierkolben erhitzt und das Destillat ($AsCl_3$) unter guter Kühlung in Wasser oder in einer anderen geeigneten Flüssigkeit aufgefangen. So läßt sich Arsen z. B. auch von Antimon und Zinn scharf trennen. Vorteilhaft ist der Zusatz von etwas Bromwasserstoff bzw. Kaliumbromid, wodurch nach *R. Bunsen*[3]) die Reduktion sehr beschleunigt wird.

Zur Untersuchung größerer Harnmengen verfährt man z. B. in der Weise, daß man den Harn zunächst auf dem Wasserbade möglichst weit eindampft, ihn nötigenfalls mit Salzsäure und Kaliumchlorat behandelt, das überschüssige Chlor vertreibt, den Rückstand mit konzentrierter Salzsäure („für forensische Zwecke"), einigen Grammen Ferrosulfat und wenig Kaliumbromid versetzt und in einem geeigneten Destillationsgefäß mit angeschlossenem guten Kühler erhitzt. Im Destillat wird dann das Arsen durch Einleiten von Schwefelwasserstoff oder durch eine andere charakteristische Reaktion nachgewiesen.

Diese Methode ist wohl für größere Arsenmengen geeignet, aber in den Fällen unbrauchbar, wo es sich darum handelt, auf die kleinsten Spuren Arsen zu prüfen. Denn die Salzsäure ist auch in ihren reinsten Präparaten immer noch arsenhaltig, so daß man, wenn man nur genügend scharfe Nachweismethoden benutzt, auf diese Weise stets eine Arsenreaktion erhalten muß. (Siehe weiter unten.)

Ein Verfahren zum schnellen Nachweis kleiner Arsenmengen in einer Flüssigkeit hat *C. E. Carlson*[4]) angegeben. Beim Einleiten von Schwefelwasserstoff scheidet sich bei sehr kleinen Arsenmengen der Sulfidniederschlag nicht sofort, sondern erst nach längerem Stehen (12 bis 24 Stunden) ab. Schüttelt man aber solch eine mit Schwefelwasserstoff behandelte, bzw. mit Schwefelwasserstoffwasser versetzte Lösung mit Äthyläther, so ballt sich das Schwefelarsen zu kleinen Flocken zusammen,

---

[1]) *E. Fischer*, Scheidung und Bestimmung des Arsens. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **13** (1880). 1778; *Liebigs* Annal. **208** (1881). 196.

[2]) *F. Hufschmidt*, Zur Trennung des Arsens von Zinn und Antimon. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **17** (1884). 2245; *Alex. Classen* u. *Rob. Ludwig*, Quantitative Analyse durch Elektrolyse. Ibid. **18** (1885). 1112; *Martin Rohmer*, Scheidung des Arsens. Ibid. **34** (1901). 33.

[3]) *R. Bunsen*, *Liebigs* Annal. **192** (1878). 321.

[4]) *C. E. Carlson* (Lund), Eine neue Methode zum leichten Nachweis und zur raschen Ausscheidung von Arsen und gewissen Metallsalzen aus Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. **68** (1910). 243.

welche in der Ätherschicht herumschwimmen. In 100 *cm*³ Lösung ist auf diese Weise noch 0·1 *mg* As in ein paar Minuten nachzuweisen: durch Zusatz von Alkohol läßt sich die Empfindlichkeit noch steigern. Bei einem Arsengehalt von 0·015 *mg* As in 100 *cm*³ 10%iger Salzsäure sieht man nach dem Schütteln mit Schwefelwasserstoffwasser und Äther an der Grenzfläche eine goldig schimmernde Zone: wird nun aber Alkohol hinzugegossen, so rollt sich das Arsensulfür zusammen und schlägt sich in leicht kenntlichen Flocken nieder. Diese gelben Flocken verschwinden beim Umschütteln, erscheinen aber auf erneuten Zusatz von Alkohol wieder.

Zum Nachweis des Arsens im Harn verfährt *Carlson* in der Weise, daß er das Arsen zunächst in der oben geschilderten Weise mit Salzsäure abdestilliert. Um das Übergehen von gelbgefärbten Harnbestandteilen zu vermeiden (die das Erkennen des Arsens erschweren würden), setzt er einige Gramm Eisenchlorid hinzu: z. B. zu dem Abdampfrückstand von 500 *cm*³ Harn 60—70 *cm*³ konzentrierte Salzsäure (spez. Gew. 1·19), 10 *g* Ferrichlorid und 5 *g* Ferrosulfat. Dieses Gemisch wird in einem Kolben von etwa 700 *cm*³ Inhalt erhitzt, der durch ein zweifach gebogenes Glasrohr mit einer Pipette (ca. 30 *cm*³) verbunden ist: diese taucht unten in eisgekühltes Wasser. Es wird so lange destilliert, bis der Pipettenbauch heiß geworden ist. Das Destillat wird im Scheidetrichter mit 15 *cm*³ Schwefelwasserstoffwasser und nach 15 Minuten mit 15 *cm*³ Alkohol versetzt, 1—2 Minuten kräftig geschüttelt. Auf Zusatz von Alkohol erscheinen dann bei Gegenwart von Arsen schöne gelbe Flocken. Bleibt die Probe negativ, so kann dieses auch durch organische Substanz verursacht sein. — Andere Metalle, wie Quecksilber, Blei und Kupfer, zeigen ein ähnliches Verhalten, jedoch sind sie schon infolge der anderen Farbe ihrer Sulfide nicht mit Arsen zu verwechseln.

Das empfindlichste Verfahren zum Nachweis sehr kleiner Arsenmengen besteht in der Überführung in Arsenwasserstoff und Zerlegung dieses Gases durch eine konzentrierte Silberlösung nach *H. W. Gutzeit* [1]) oder durch Glühen in einem schwer schmelzbaren Glasrohr nach *Marsh-Liebig* [2]).

Die **Gutzeitsche Reaktion** wird in der Weise ausgeführt, daß man in einem Reagenzglase (oder anderem passenden Gefäß, Erlenmeyerkolben z. B.) die zu prüfende, mit Salzsäure angesäuerte Lösung mit einigen Zinkstückchen zusammenbringt, in die Öffnung einen losen Wattebausch hineinschiebt und dann einen Papierstreifen mit einem Tropfen konzentrierter Silbernitratlösung (1:1) darüber legt. Der mit dem Wasserstoff ent-

[1]) *H. W. Gutzeit,* Bemerkungen zur Revision der Pharmacopoea Germanica. Pharmazeut. Zeitung. **1879**. 263. Ferner: *Poleck* und *Thümmel,* Über die Arsenprobe der Pharmacopoë und einige neue Silberverbindungen. Archiv d. Pharm. **22** (1884). 1.

[2]) *James Marsh,* Beschreibung eines neuen Verfahrens, um kleine Quantitäten Arsenik von den Substanzen abzuscheiden, womit er gemischt ist. Edinburgh New Philos. Journ. **21** (1836). 229; *Liebigs* Annal. d. Pharm. **23** (1837). 207. mit Nachschrift von *P. Mohr* und *J. Liebig.*

wickelte Arsenwasserstoff färbt den Silbernitratfleck zitronengelb unter Bildung einer Doppelverbindung ($Ag_3As + 3AgNO_3$), um den gelben Fleck bildet sich ein schwarzer Rand durch Zersetzung der Doppelverbindung. Beim Befeuchten mit Wasser wird der ganze gelbe Fleck schwarz (Silberabscheidung). Diese *Gutzeit*sche Probe, die recht empfindlich ist (nach *Beckurts*[1]) bis zu 0·002 *mg* As_2O_3), läßt sich nur mit kleiner Flüssigkeitsmenge anstellen: auch ist ihr Wert etwas dadurch beeinträchtigt, daß andere Gase (z. B. H_2S, H_3P) mit Silbernitrat ähnliche Färbungen geben.

Statt Silbernitrat läßt sich nach *Thomson*[2]) auch Quecksilberchlorid benutzen; dieses gibt mit Arsenwasserstoff eine gelbbraune Verbindung. *Ch. R. Sanger* und *O. F. Black*[3]) empfehlen Streifen von *Whatman*schem Zeichenpapier mit 5%iger Lösung von Quecksilberchlorid zu sättigen und zu trocknen; mit diesen Streifen lassen sich auch quantitative Bestimmungen ausführen.

Der **Arsennachweis nach Marsh-Liebig** ist im Laufe der Jahre von den verschiedensten Forschern modifiziert und in neuerer Zeit zu der empfindlichsten und zuverlässigsten Methode ausgebildet worden. Sie ist in all den Fällen nicht zu umgehen, wo es sich darum handelt, ganz geringe Spuren Arsen mit Sicherheit nachzuweisen. Für diesen Zweck sind aber auch die gewöhnlichen Zerstörungsverfahren für die organische Substanz und die Abscheidungsverfahren für das Arsen nicht zu gebrauchen, da die dazu erforderlichen Reagenzien nicht völlig arsenfrei zu erhalten sind. Das gilt in erster Linie für die Salzsäure: denn bei genauer Prüfung findet sich auch in den reinsten Präparaten („für forensische Zwecke" od. dgl.) der besten Firmen immer noch Arsen, sobald man nur mehr als etwa 20 *cm*³ untersucht. Auch in größeren Mengen Schwefelsäure und Salpetersäure, wie sie z. B. für das *Neumann*sche Säuregemisch-Veraschungsverfahren notwendig sind, ist soviel Arsen enthalten, daß dieses bei ganz genauen Untersuchungen störend wirkt.

(Zu S. 393.) Für solche Fälle ist von *G. Lockemann*[4]) ein Verfahren angegeben, welches darin besteht, daß man die organische Substanz nach Vorbehandlung mit wenig Salpetersäure-Schwefelsäuregemisch der Salpeterschmelze (mit gereinigtem Natrium-Kaliumnitrat) unterwirft und in der neutralisierten Lösung dieser Schmelze durch Adsorption mit Eisenhydroxyd das Arsen abscheidet; dieses wird dann im *Marsh*schen Apparat nachgewiesen.

[1]) *H. Beckurts*, Jahresber. d. Pharm. 1883/84, 475.

[2]) *Thomson*, Royal Commission on Arsenical Poisoning. Final Report, 2, 58 (London 1903).

[3]) *Ch. R. Sanger* und *O. F. Black*, Bestimmung von Arsen durch die *Gutzeit*sche Methode. Journ. Soc. Chem. Ind. **26** (1907), 1115; Zeitschr. f. anorgan. Chemie **58** (1908), 121.

[4]) Dieses Verfahren, welches in der ursprünglichen Form [*G. Lockemann*, Über den Arsennachweis mit dem *Marsh*schen Apparate. Zeitschrift für angewandte Chemie **18** (1905), 416] in Band **1** dieses Werkes, S. 393—396, beschrieben war, ist inzwischen in mehrfacher Beziehung modifiziert und soll deswegen hier in der neuesten Form noch einmal geschildert werden.

Die für dieses Salpeterschmelzverfahren erforderlichen Säuren erweisen sich in den hier in Betracht kommenden geringen Mengen, wenn man die reinsten *Kahlbaum*schen Präparate verwendet, meistens als arsenfrei. Die Alkalinitrate werden nötigenfalls in der weiter unten beschriebenen Weise gereinigt.

Prüfung und Reinigung der Chemikalien.

Die Schwefelsäure prüft man, indem man sie in etwa 20%iger Lösung in den *Marsh*schen Apparat bringt (s. unten), und zwar mindestens in solchen Mengen, wie sie für die einzelnen Untersuchungen zur Verwendung kommen.

Die rauchende Salpetersäure ist natürlich ohne weiteres zur Prüfung im *Marsh*schen Apparat nicht zu gebrauchen. Eine gemessene Menge (10—20 cm^3) wird mit etwa 10% konzentrierter Schwefelsäure vermischt und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade (mit Porzellanringen) vorsichtig abgedampft. Die Erhitzung wird so lange fortgesetzt, bis eine Tüpfelprobe des Rückstandes mit Diphenylamin-Schwefelsäure (1 Teil Diphenylamin in 100 Teilen konzentrierter Schwefelsäure) keine Blaufärbung mehr ergibt.

Der Abdampfungsrückstand (Schwefelsäure) wird, mit Wasser verdünnt, im *Marsh*schen Apparat geprüft.

Die Nitrate von Natrium und Kalium enthalten meistens Spuren von Arsen, die sich nach dem Eisenfällungsverfahren nachweisen lassen. In neuerer Zeit liefert allerdings die Firma *Kahlbaum* auch Präparate, die sich in den hier in Betracht kommenden Mengen als arsenfrei erweisen. Jedoch ist es immer ratsam, oder bei genauen Versuchen notwendig, sich selbst von der Arsenfreiheit zu überzeugen, da auf irgend eine unkontrollierbare Weise geringe Verunreinigungen hineingeraten sein könnten. Die Reinigung der Nitrate wie die anderer neutraler Salze von Arsen geschieht auf Grund der von *G. Lockemann* und *M. Paucke* ausgeführten Untersuchungen[1]) durch Fällung von Eisenhydroxyd in ihren abgekühlten Lösungen. Das Arsen wird auf diese Weise durch die Adsorptionswirkung des Eisenhydroxyds aus der Lösung entfernt. Hierzu ist eine Eisenlösung und eine Ammoniaklösung von bestimmtem Gehalt nötig.

Für die Eisenlösung verwendet man am besten den Eisenammoniakalaun, das krystallisierte Ferriammoniumsulfat ($FeNH_4(SO_4)_2$, $12H_2O$). Von diesem Salz werden 226 (genau 225·6) *g* mit destilliertem Wasser zu 1 *l* gelöst; 1 cm^3 dieser Lösung entspricht 50 *mg* $Fe(OH)_3$ oder 10 cm^3 entsprechen 0·5 *g* $Fe(OH)_3$. Nimmt man das reinste *Kahlbaum*sche Präparat, so ist in 20 cm^3 einer derartigen Lösung kein Arsen nachzuweisen. Natürlich könnte man auch Lösungen von beliebig anderem, aber bekanntem Eisengehalt verwenden.

---

[1]) *G. Lockemann* und *M. Paucke*, Über die Adsorption von Arsen durch Aluminium- und Eisenhydroxyd. Zeitschr. f. Chemie u. Industrie d. Kolloide. Bd. 8 (1911). 273.

Der Ammoniaklösung gibt man eine derartige Konzentration, daß zur Fällung eines Volumens Eisenlösung das gleiche Volumen Ammoniaklösung erforderlich ist. Es hat sich bei den oben erwähnten systematischen Versuchen über die Adsorption des Arsens durch Eisenhydroxyd herausgestellt, daß die Adsorption am besten verläuft, wenn genau die stöchiometrischen Mengen Ammoniak zur Anwendung kommen, daß, mit anderen Worten, ein größerer Überschuß des Fällungsmittels nachteilig wirkt. Der Eisenlösung von dem angegebenen Gehalt würde eine Lösung äquivalent sein von 23·9 *g* Ammoniak im Liter, d. i. 1·404 normal. Da nun beim längeren Aufbewahren und wiederholten Öffnen der Flasche immer ein gewisser Teil Ammoniak sich verflüchtigt und da andrerseits ein geringer Überschuß für die Adsorptionswirkung nicht besonders nachteilig ist, so wird man die Ammoniaklösung in der Weise am einfachsten herstellen, daß man eine 10%ige Lösung auf das 4fache verdünnt, sodaß man eine Lösung von ca. 2·5% NH_3 = 1·47 n erhält. Man prüft durch Titration mit Normalsäure (Lackmus oder Methylorange als Indikator): wenn 10 *cm*³ Ammoniaklösung ca. 14·5 (zwischen 14 und 15) *cm*³ 1 n-Säure verbrauchen, dann ist die Lösung richtig eingestellt.

Da nun die Ammoniaklösungen durchweg auch einen gewissen Arsengehalt haben, so ist es ratsam, entweder die ursprüngliche Ammoniaklösung zunächst längere Zeit mit frisch gefälltem, ausgewaschenem Eisenhydroxyd zu schütteln oder die Gebrauchslösung dauernd über einer gewissen Menge Eisenhydroxyd aufzubewahren, wobei die Flasche von Zeit zu Zeit umzuschütteln und die jedesmal zu verwendende Menge Ammoniaklösung zunächst zu filtrieren ist. Zur Prüfung der Ammoniaklösung verdampft man ein bestimmtes Volumen auf dem Wasserbade nicht ganz zur Trockne; der Rückstand wird mit etwas verdünnter Schwefelsäure aufgenommen und in den *Marsh*schen Apparat gebracht.

Diese Eisen- und Ammoniaklösungen werden auch für die Abscheidung des Arsens zum Nachweis und zu seiner Bestimmung benutzt (s. unten).

Die Reinigung des Natrium- und Kaliumnitrats führt man nun in der Weise aus, daß man diese Salze in Wasser löst, z. B. 500 *g* $NaNO_3$ in 650 *cm*³, 500 *g* KNO_3 in 3 *l* Wasser, zu den Lösungen je eine bestimmte Menge Eisenlösung, z. B. 25 *cm*³, hinzufügt und sie unter Umrühren in Eis abkühlt. In der Kälte wird dann durch Zusatz des gleichen Volumens Ammoniaklösung das Eisenhydroxyd ausgefällt und nach kurzem Stehen durch ein Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wird in gleicher Weise, aber nur mit 10 *cm*³ Eisen- und Ammoniaklösung behandelt. Dieser zweite Eisenhydroxydniederschlag dient zur Prüfung, ob die Salpeterlösungen nunmehr arsenfrei sind. Er wird auf dem Filter mit kaltem Wasser ausgewaschen, bis das ablaufende Waschwasser mit Diphenylamin-Schwefelsäure bei der Tüpfelprobe auf Porzellan keine Blaufärbung mehr gibt.

Das Eisenhydroxyd wird sodann in etwa 25 *cm*³ heißer 20%iger Schwefelsäure gelöst, und diese Lösung wird nach dem Abkühlen im

*Marsh*schen Apparat geprüft (s. unten). Sollte bei dieser Kontrolle noch Arsen gefunden werden, so müßten die Salpeterlösungen noch einmal mit einer größeren Menge Eisen- und Ammoniaklösung behandelt werden, bis die letzte Kontrolle die Arsenfreiheit erweist.

Die Fällung des Eisenhydroxyds kann man auch bei gewöhnlicher Temperatur ausführen, doch wird die Adsorptionswirkung durch die Eiskühlung noch gesteigert.

Die auf diese Weise gereinigten und geprüften Salpeterlösungen werden nun teils als Lösungen aufbewahrt (etwa zur Hälfte), teils zur Gewinnung der festen Salze eingedampft. Durch Bestimmung des spezifischen Gewichtes kann man leicht den Salzgehalt der durch die Reinigungsmethode etwas verdünnten Lösungen erfahren. Ist man den hier gemachten Angaben gefolgt, so wird man durch Vermischen äquivalenter Lösungsmengen (etwa der Hälften der beiden Lösungen) eine Lösung von etwa 23% Natriumkaliumnitrat erhalten.

Die anderen Hälften der Lösungen engt man in Schalen auf dem Wasserbade ein, bis der größte Teil der Salze ausgeschieden ist. Nach dem Erkalten trocknet man die Salze an der Luft auf mehrfachen Lagen Fließpapier und mischt gleiche Teile miteinander. Dieses Salzgemisch wird in einer Pulverflasche aufbewahrt, um für die Salpeterschmelze verwendet zu werden.

Zerstörung der organischen Substanz nach dem Salpeterschmelzverfahren.

Der erste Teil des Zerstörungsverfahrens, die Säurebehandlung, muß je nach Art des Untersuchungsobjektes etwas modifiziert werden, wie das aus den weiter unten beschriebenen Beispielen hervorgeht.

Für die eigentliche Salpeterschmelze lassen sich Geräte aus Kupfer, Nickel, Silber nicht verwenden, da sie durch den schmelzenden Salpeter angegriffen werden. Auch die Quarzgefäße sind für diesen Zweck unbrauchbar: sie zerspringen beim Abkühlen, selbst wenn man die Hauptmenge der Schmelze heiß ausgießt.

Porzellantiegel haben sich dagegen noch besser bewährt. Zwar zerspringen sie auch meistens, wenn man die ganze Schmelze darin erkalten läßt; gießt man aber die Hauptmasse des Schmelzflusses aus (etwa in eine Schale mit Wasser), so bleibt der Tiegel beim weiteren Abkühlen unversehrt. Man kann auch so verfahren, daß man, statt den Schmelzfluß auszugießen, in die eben erstarrende Schmelzmasse, während der Tiegel auf einer Porzellanunterlage (umgekehrtem Tiegeldeckel oder Schale) steht, vorsichtig zunächst wenig, allmählich mehr kaltes Wasser hineinspritzt, so daß man auf diese Weise sogleich eine heißgesättigte Salzlösung erhält. [1])

[1]) Dieses Verfahren wurde von Dr. *Hans Winkler* ausprobiert.

Am geeignetsten für die Salpeterschmelze sind jedoch die Platingeräte, da diese völlig widerstandsfähig sind, vorausgesetzt, daß man nicht zu stark erhitzt. Der Platintiegel oder die Platinschale wird auf ein sauberes Tondreieck (am besten mit Platinblechen umwickelt) gesetzt und mit einer nicht zu großen Flamme erhitzt, sodaß die Salzschmelze eben noch im Fluß bleibt; dann wird das Platin nicht angegriffen. Wegen des guten Wärmeleitungsvermögens ist bei Platin schon kein so starkes Erhitzen notwendig wie bei Porzellan, um die Wärme auch auf die oberen Teile der Seitenwandungen zu verteilen und das Schmelzen der Masse im Gange zu halten.

An einigen Beispielen soll das Zerstörungsverfahren näher erläutert werden.

1. Harn.

a) Säurebehandlung. Der Harn (in einzelnen Proben oder die ganze Tagesmenge) wird zunächst gemessen und mit Salpeter versetzt, indem man 10—15% seines Volumens von der oben beschriebenen Salpeterlösung (23% $(NaK)NO_3$) oder 2·5—3·5% festes Natriumkaliumnitrat hinzufügt; dann wird das Gemisch in einer nicht zu großen Porzellanschale unter wiederholtem Nachfüllen auf dem Wasserbade eingedampft. Bei Flüssigkeiten ist das Vermischen mit Salpeter von vornherein deshalb vorteilhaft, weil dann der Trockenrückstand die organische Substanz gleich möglichst innig mit dem Salpeter gemischt enthält.

Der Abdampfrückstand wird (auf einem Wasserbade mit Porzellanringen und unter einem gut ziehenden Abzuge) nach und nach mit einem Gemisch von 9 Teilen rauchender Salpetersäure und 1 Teil konzentrierter Schwefelsäure (Säuregemisch) behandelt. Sollte der Abdampfrückstand schon ganz trocken sein, so muß er zunächst erst wieder etwas angefeuchtet werden, da sonst die Reaktion mit dem Säuregemisch zu lebhaft werden und zur Entzündung der Masse führen kann. Von der Säure fügt man tropfenweise (aus einem Meßzylinder) mit wiederholten Pausen unter möglichst gleichmäßiger Verteilung auf den ganzen Schaleninhalt so viel hinzu, daß im ganzen etwa 1% der Harnmenge, jedoch nicht unter 5 cm^3 gebraucht werden. Man erhält einen gelbbraunen Rückstand, der dann weiterhin mit Salpeter geschmolzen wird.

b) Die Salpeterschmelze führt man in der Weise aus, daß man in einer Schale oder einem Tiegel aus Platin oder Porzellan (s. oben) zunächst 5—10 *g* gereinigtes Natriumkaliumnitrat mit möglichst kleiner Flamme zum Schmelzen bringt und dann den Abdampfrückstand von der Säurebehandlung in kleinen Portionen mit einem Platinspatel einträgt, wobei man jedesmal so lange wartet, bis nach dem Aufblähen der Schmelzmasse völlige oder fast völlige Veraschung eingetreten ist. War der Abdampfrückstand gar zu trocken, so kann bei zu schnellem Eintragen bisweilen Entzündung eintreten. Um dieses zu vermeiden, feuchtet man die Masse etwas an; vielleicht ist es auch notwendig, noch etwas Salpeter hinzuzufügen.

2. Blut.

a) Säurebehandlung. Zur vollständigen Zerstörung des Blutes ist wegen des hohen Gehaltes an Eiweiß, Hämoglobin und anderen organischen Stoffen entsprechend mehr Salpeter erforderlich. Eine Reihe von Versuchen zeigte, daß für 50 *cm*³ Blut 150—200 *cm*³ der 23%igen Salpeterlösung notwendig sind, also das 3—4fache Volumen an Lösung oder für 1 Teil Blut ¾—1 Teil feste Salpetermischung.

Blutserum braucht etwas weniger; es genügt das 2—3fache Volumen an Salpeterlösung oder ½—¾ Teile feste Salpetermischung.

Das zu untersuchende Blut oder Serum wird mit der erforderlichen Menge Salpeterlösung vermischt und in einer Porzellanschale unter wiederholtem Umrühren (da sich immer wieder eine Decke von gerinnendem Eiweiß abscheidet) auf dem Wasserbade eingedampft. Bevor das Gemisch ganz trocken ist, wird es vorsichtig tropfenweise mit dem Säuregemisch versetzt: man fügt im ganzen etwa 10—20% des ursprünglichen Blut- oder Serumvolumens hinzu, unter möglichster Verteilung auf die ganze Masse. Dabei tritt unter Aufblähen und Verfärben der Masse ziemlich starke Reaktion ein. War der Abdampfrückstand schon völlig trocken, so muß er vor der Säurebehandlung zunächst erst wieder etwas angefeuchtet werden, da sich sonst die ganze Masse entzünden kann.

b) Die Salpeterschmelze wird in der gleichen Weise ausgeführt wie beim Harn angegeben. Das Eisen des Hämoglobins scheidet sich in dem unteren Teil der Schmelze als rotbraunes Oxyd ab.

3. Organteile (Fleisch).

a) Säurebehandlung. Feste Organteile (Fleisch) werden zunächst mit sauberen Messern oder Scheren möglichst zerkleinert und dann in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade allmählich mit dem Säuregemisch versetzt; im ganzen wird auf 1 Teil Fleisch etwa ½ Teil Säuregemisch verwendet. Dabei verwandeln sich die Organteile unter Aufblähen in eine dickflüssige gelbliche Masse. Durch zu schnelles Hinzufügen der Säure kann unter Rauchentwicklung Verkohlung eintreten.

Der Rückstand der Säurebehandlung wird dann mit soviel Salpeterlösung verrührt, als der 5—6fachen Menge der ursprünglichen Substanz entspricht, so daß die 1¼—1½fache Menge festes Salpetergemisch zur Anwendung kommt. Beim Eindampfen dieser Mischung bleibt zuletzt ein gelber krystallinischer Rückstand.

b) Die Salpeterschmelze wird in der gleichen Weise wie unter 1 und 2 ausgeführt.

Abscheidung des Arsens durch Eisenhydroxyd.

Zur Abscheidung des Arsens aus der Zerstörungsmasse verfährt man folgendermaßen: Die Salpeterschmelze wird mit Wasser in ein Becherglas gebracht (hat man ein Platingefäß für die Schmelze verwendet, so setzt man dieses am besten noch heiß in kaltes Wasser, die erstarrende Schmelze

löst sich dann leicht von der Wandung ab) und unter Erwärmen gelöst. Dabei fügt man unter Umrühren allmählich aus einem Meßzylinder verdünnte (20%) Schwefelsäure hinzu, solange sich noch Kohlensäure und Stickoxyde entwickeln; man prüft mit einem Tropfen auf Lackmuspapier und setzt soviel Säure hinzu, daß die Reaktion schwach sauer bleibt. Sind dann alle Gase unter Erhitzen ausgetrieben, so läßt man erkalten, fügt einige Tropfen Methylorange hinzu und neutralisiert die Lösung mit Ammoniak.

Da die Adsorptionswirkung des Eisenhydroxyds mit sinkender Temperatur zunimmt, so ist es ratsam, die Lösung durch Einsetzen in Eis abzukühlen; jedoch ist das nicht unbedingt erforderlich. Man läßt dann von der oben erwähnten Eisenlösung (am bequemsten aus einer Bürette) eine bestimmte Anzahl Kubikzentimeter hinzulaufen, und nachdem diese mit der Lösung gleichmäßig vermischt sind, fügt man dasselbe Volumen von der eingestellten Ammoniaklösung unter Umrühren hinzu.

Bei der Bearbeitung von Harn und Fleisch wird in der ersten Fällung der größte Teil des Eisens als helles Ferriphosphat abgeschieden. Dadurch wird die Adsorptionskraft des Eisens für Arsen beeinträchtigt, und man wird in solchen Fällen — natürlich je nach Menge und Arsengehalt des Untersuchungsobjekts und nach Menge der angewendeten Eisenlösung — das Arsen größtenteils vielleicht erst in der zweiten Fällung finden.

Der Eisenniederschlag wird nach etwa halbstündigem Stehen abfiltriert und zur Entfernung der anhaftenden Salpeterlösung mit kaltem Wasser ausgewaschen, bis das Waschwasser mit Diphenylamin keine Salpeterreaktion mehr gibt. Dieses Auswaschen geht bei gewöhnlichen Eisenhydroxydfällungen ziemlich schnell, dauert jedoch bei den weniger durchlässigen Phosphatfällungen länger. Das Waschwasser fängt man gesondert auf und engt es auf dem Wasserbade ein, um es dann der Hauptlösung vor der zweiten oder (z. B. bei den phosphorhaltigen Objekten, die mehrere Fällungen erfordern) zusammen mit den eingeengten Waschwässern der folgenden Fällungen vor der letzten Fällung wieder zuzufügen. Man muß die Eisenfällungen natürlich so lange wiederholen, bis sich der letzte Niederschlag als ganz oder fast arsenfrei erweist.

Es würde sich z. B. empfehlen, bei der Verarbeitung von 1/2 Liter Harn von der Eisen- und der Ammoniaklösung folgende Mengen für die einzelnen Fällungen zu verwenden: 1. 25 cm^3, 2. 15 cm^3, 3. 10 cm^3, eventuell 4. 5 cm^3. War weniger Substanz in Arbeit genommen und ist vor allem kein starker Phosphatniederschlag zu erwarten, so wird man zuerst 20 oder 10 cm^3 nehmen und die zweite (Kontroll-)Fällung mit 5 cm^3 ausführen. Für die Bemessung der Eisenmengen ist natürlich auch der Arsengehalt maßgebend. Unter normalen Verhältnissen würden 10 cm^3 der Eisenlösung (entsprechend 500 *mg* $Fe(OH)_3$) genügen, um aus 100 cm^3 Lösung etwa 25 *mg* Arsen bei 25° oder etwa 35 *mg* Arsen bei 0° völlig zu adsorbieren.

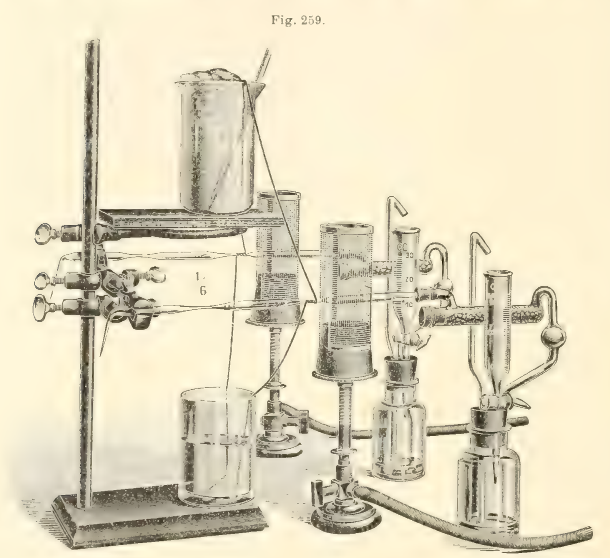
Die einzelnen Eisenfällungen werden nach Beendigung des Auswaschens in heißer 20%iger Schwefelsäure gelöst und die Lösung mit derselben

Säure auf ein bestimmtes Volumen (z. B. 50 oder 100 *cm*³) aufgefüllt. Diese schwefelsauren Lösungen werden dann zur Prüfung im *Marsh*schen Apparat benutzt.

Arsennachweis im *Marsh*schen Apparat.

Der im Hauptkapitel dieses Buches (Bd. I, S. 394—396) beschriebene und abgebildete Apparat von *G. Lockemann* zum Nachweis des Arsens nach *Marsh-Liebig* enthält zum Trocknen der Gase weder Baumwolle oder ähnliches Stopfmaterial noch gekörntes oder geschmolzenes Chlorcalcium oder gar Ätzkali, da alle diese Stoffe auf Arsenwasserstoff zer-

Fig. 259.



Arsenapparate nach *G. Lockemann.*

setzend wirken. Zum Trocknen der Gase wird das krystallisierte Calciumchlorid ($CaCl_2$, $6 H_2O$) benutzt. Durch diese und die übrigen Versuchsbedingungen ist die Empfindlichkeit des Arsennachweises auf 0·0001 *mg* = 0·1 *mmg* (Milliogramm) As gesteigert.

Als Kühlgefäß benutzt man statt der Porzellanschale *m* (Abb. Bd. I, S. 395) vorteilhafter ein Becherglas; dieses wird, wie Fig. 259 zeigt, auf ein etwa 10 *cm* breites und 18 *cm* langes Brett gestellt, welches auf dem Stativring mit einigen von unten eingetriebenen Nägeln befestigt ist. Das Becherglas faßt mehr Kühlflüssigkeit als eine Schale und ist auf dem Tragbrett verschiebbar, so daß seine Stellung der jeweiligen Lage des Kühlfadens angepaßt werden kann.

Hat man eine größere Zahl von Arsenuntersuchungen auszuführen, so empfiehlt es sich, mehrere Apparate zu je zweien rechts und links von einem Stativ (s. Fig. 259) aufzustellen und das Verdrängen der Luft durch Einleiten von Wasserstoff, der in einem *Kipp*schen Apparat entwickelt wird, zu beschleunigen. Der *Kipp*sche Apparat wird für diesen Zweck am besten mit einer Zinkkupferlegierung beschickt, welche 90% Zn und 10% Cu enthält[1], und als Säure benutzt man die „Salzsäure für forensische Zwecke". Das Zink mit dem hohen Kupfergehalt hat nämlich die Eigenschaft, Arsen zurückzuhalten, so daß man auf diese Weise trotz eines gewissen Arsengehalts der Salzsäure reinen Wasserstoff erhält. Man wäscht das Gas dann nur mit gewöhnlichem Wasser oder mit verdünnter Sodalösung. Benutzt man dagegen zur Wasserstoffentwicklung im *Kipp*schen Apparat das gewöhnliche Zink und die gewöhnliche „reine" Salzsäure, so ist es notwendig, außerdem noch eine oder zwei Waschflaschen mit möglichst konzentrierter Kaliumpermanganatlösung vorzuschalten[2], um den mitentwickelten Arsenwasserstoff vor dem Einleiten in den *Marsh*schen Apparat zu absorbieren. Die letzte Waschflasche wird mit einem Gabelrohr verbunden, von welchem aus Gummischläuche zu den schräg nach unten umgebogenen oberen Enden der Steigrohre (siehe Fig. 259) zweier nebeneinander aufgestellter *Marsh*scher Apparate führen. Zur gleichmäßigen Regulierung des doppelten Gasstromes kann man die beiden Gummischläuche mit Schraubenquetschhähnen versehen.

Bei der Ausführung des Arsennachweises verfährt man nun folgendermaßen: In die Entwicklungsgefäße der *Marsh*schen Apparate bringt man 5—6 Stückchen verkupferten Zinks, hergestellt aus garantiert arsenfreiem Stangenzink „Kahlbaum", welches zerkleinert in einer 1/2%igen Kupfersulfatlösung etwa 1 Minute hin und her gerüttelt und dann mit Wasser mehrmals abgespült wurde. Die Apparate werden geschlossen und aus den Hahntrichtern läßt man 10 cm^3 Wasser hineinlaufen, so daß die unteren Öffnungen der Steigrohre ganz in Wasser eintauchen. Sodann werden die Glühröhren mit Gummistopfen in die Ansätze der Trockenrohre eingesetzt und auf dem anderen Ende zwischen Klammern befestigt. Nachdem die oberen Öffnungen der Steigrohre mit den vom *Kipp*schen Apparat herführenden Gummischläuchen verbunden sind, öffnet man den Hahn des *Kipp*schen Apparates und überzeugt sich zunächst, ob die *Marsh*schen Apparate völlig dicht halten. Ist dieses der Fall, so bricht man die Spitzen der Glühröhren ab und leitet etwa 1/2 Stunde lang den Wasserstoffstrom durch die Apparate. Alsdann läßt man aus den Hahntrichtern 10 cm^3 40%ige Schwefelsäure in die Entwicklungsgefäße fließen, welche, durch die darin vorhandene gleiche Wassermenge auf die halbe Konzentration verdünnt, mit den Zinkstückchen alsbald Wasserstoff entwickelt.

[1] Die Firma *Kahlbaum* stellt diese Legierung für den genannten Zweck in Stangen her.

[2] *H. Reckleben* und *G. Lockemann*, Über die Reinigung des Wasserstoffgases von seinem Arsengehalt. Zeitschr. f. angewandte Chemie, Bd. 21 (1908), 433.

Nach Entfernung der Gummischläuche von den Steigrohren sind die Apparate gebrauchsfertig.

Die Gasflammen werden entzündet und richtig eingestellt, die Drahtnetzschutzhüllen aufgesetzt und die feuchten Kühlfäden um die verengten Stellen der Glühröhren zwei- bis dreimal herumgeschlungen, während das obere Becherglas ganz mit Eis und Wasser gefüllt wird. Bemerkt man nach einiger Zeit im Innern der gekühlten Stelle weder Wassertropfen noch Arsenspiegel (zur Prüfung des verwendeten Zinks und der Schwefelsäure muß man natürlich zu Anfang einer Versuchsserie einige blinde Versuche auf die Dauer von etwa 2 Stunden durchführen), so bringt man von den zu prüfenden Lösungen abgemessene Mengen, etwa $^1/_{10}$ oder $^1/_4$, in die Hahntrichter und läßt sie unter Nachspülen mit 20%iger Schwefelsäure in die Apparate laufen.

Benutzt man keinen *Kipp*schen Apparat, so läßt man in die Entwicklungsgefäße zu Anfang nicht Wasser, sondern gleich 20%ige Schwefelsäure laufen und wartet mindestens $^3/_4$ Stunden, bis man die Flamme entzündet. Die vorher geschilderte Methode hat außer der schnellen Verdrängung der Luft noch den Vorzug, daß das Zink zu Anfang geschont wird und dann für die Gasentwicklung nach Zusatz der zu prüfenden Lösung frisch zur Verfügung steht.

Nach 2 Stunden, während welcher Zeit man die Gasentwicklung (nötigenfalls unter weiterem Zusatz von Säure) und die Kühlung (unter Nachfüllen von Eisstücken und vielleicht auch Anfeuchten der Kühlfäden mit Hilfe eines pipettenartigen Glasrohres, das man in das Kühlwasser getaucht hat) kontrolliert, wird der Versuch abgebrochen.

Bei zuverlässigen Untersuchungen ist es natürlich erforderlich, Kontrollversuche mit sämtlichen Chemikalien in den gleichen Mengen anzustellen, wie sie für die Verarbeitung der Untersuchungsobjekte erforderlich waren. Denn erweisen sich die einzelnen Chemikalien bei ihrer Prüfung vielleicht auch als arsenfrei, so ist es doch nicht ausgeschlossen, daß durch die Häufung ganz geringer und im einzelnen nicht erkennbarer Arsenspuren in der Gesamtmischung schließlich nachweisbare Mengen vorzufinden sind, die dann bei der Beurteilung der Arsenspiegel mit zu berücksichtigen wären.

Quantitative Analyse.

Zu S. 401.

Zur Zerstörung der organischen Substanz für die Bestimmung von Halogenen, Schwefel, Phosphor, Arsen wird sich in vielen Fällen die Natriumsuperoxydmethode von *H. Pringsheim* [1]) anwenden lassen, die bereits in Band I, S. 368—371 näher beschrieben ist.

[1]) Neueste Beschreibung des Verfahrens: *H. Pringsheim*, Über den Gebrauch des Natriumsuperoxyds zur quantitativen Analyse organischer Verbindungen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. **41** (1908). 4267.

Zu S. 417. Für die **Chlorbestimmung** ist zu bemerken, daß man bei Anwendung des *Gooch*schen Tiegels das Halogensilber vorteilhafterweise nicht glüht, sondern bei 100—110° trocknet und so nach dem Abkühlen im Exsikkator zur Wägung bringt. Auf diese Weise kann man natürlich eine ganze Reihe von Halogenbestimmungen hintereinander mit demselben *Gooch*schen Tiegel ausführen, ohne das Asbestfilter erneuern zu müssen, und darin liegt gerade die Hauptannehmlichkeit dieser Arbeitsmethode.

Zu S. 422. Für die **Schwefel**bestimmung im Harn mittelst Natriumsuperoxyd sind auch besondere Vorschriften gegeben. Nach *G. Modrakowski*[1]) bringt man in eine Nickelschale 1—2 *g* Natriumsuperoxyd und läßt 50 *cm*³ Harn langsam darauf tropfen; dabei findet mäßiges Schäumen, aber kein Verspritzen statt. Das Gemisch wird bis zur Sirupdicke eingedampft und dann vorsichtig mit weiteren 2—3 *g* Na_2O_2 in kleinen Mengen unter Umrühren versetzt. Ist die Reaktion ruhiger geworden, so wird die Schale vom Wasserbade entfernt und zunächst mit kleiner Spiritusflamme erwärmt, bis die Wasserdampfentwicklung aufhört, dann mit stärkerer Spiritusflamme, nötigenfalls unter nochmaligem Zusatz von 1 bis 3 *g* Na_2O_2. Wenn die Masse braun und dickflüssig wird, ist die Reaktion beendigt. Nach dem Erkalten wird in heißem Wasser gelöst, filtriert, mit Salzsäure schwach angesäuert und mit Baryumchlorid gefällt.

E. Abderhalden und *C. Funk*[2]) benutzen zu dem gleichen Zweck die *Pringsheim*sche Methode, indem sie 10 *cm*³ Harn mit wenig Soda und 0·4 *g* reinem Milchzucker in einem Nickeltiegel[3]) auf dem Wasserbade zur Trockne verdampfen, den Rückstand mit 6·4 *g* Natriumsuperoxyd mit einem Platinspatel gut vermischen, den Tiegel in Wasser stellen und den Inhalt mit einem glühenden Eisennagel entzünden und im übrigen wieder verfahren, wie angegeben.

C. G. L. Wolf und *E. Österberg*[4]) empfehlen dagegen für **Schwefel-** und **Phosphor**bestimmungen in organischen Substanzen ein Zerstörungsverfahren, bei dem sie die von *S. R. Benedict*[5]) ursprünglich für Harn vorgeschlagene Oxydationslösung von Kupfernitrat und Kaliumchlorat benutzen. Dieses Reagens wird hergestellt, indem 200 *g* krystallisiertes Kupfernitrat und 50 *g* Kalium- oder Natriumchlorat in 1 *l* Wasser gelöst werden. Um die Oxydation vollkommen zu machen, wird die Substanz zunächst in einem etwa 300 *cm*³ fassenden, birnenförmigen Kolben mit langem Hals mit 20 *cm*³ rauchender Salpetersäure anfangs gelinde, dann stärker erhitzt, bis alles gelöst ist und keine Salpeterdämpfe

---

[1]) *G. Modrakowski*, Über die Schwefelbestimmung im Harn mittels Natriumsuperoxyd. Zeitschr. f. physiolog. Chemie 38 (1903). 562.

[2]) *E. Abderhalden* und *C. Funk*, Die Schwefelbestimmung im Urin. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. 58 (1908). 331 und 59 (1909). 121.

[3]) Von *F. Köhler*, Leipzig, Josephinenstr. 35, zu beziehen.

[4]) *C. G. L. Wolf* und *E. Österberg*, Die quantitative Bestimmung von Schwefel und Phosphor. Biochem. Zeitschr. 29 (1910). 429.

[5]) *S. R. Benedict*, Über die Bestimmung des Gesamtschwefels im Harn. Journ. of Biolog. Chem. 6 (1909). 363.

mehr entweichen. Nötigenfalls muß noch mehr Salpetersäure hinzugefügt werden.

Der Rückstand wird mit Wasser in eine 150 cm^3 fassende Porzellanschale (oder einen Tiegel) gespült, mit 20 cm^3 der *Benedict*schen Lösung versetzt und im Sandbade zur Trockne verdampft. Dann wird auf offener Flamme erhitzt und, wenn der Gefäßboden rotglühend ist, noch 20 Minuten lang das Glühen fortgesetzt. Nach dem Abkühlen fügt man 25 cm^3 Salzsäure (1:4) hinzu und erwärmt, bis der ganze schwarze Bodensatz aufgelöst ist. Die Lösung wird in einen Erlenmeyerkolben von $^1/_2$ *l* Inhalt übertragen, mit 150 cm^3 Wasser verdünnt und $^1/_4$ Stunde gekocht. Man läßt über Nacht stehen, filtriert (Kieselsäure) und fällt dann mit Baryumchlorid.

Zu S. 419. Für die Phosphorbestimmung wird das Filtrat vom Baryumsulfat auf 250 cm^3 eingeengt, mit 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure versetzt und filtriert. Dieses vom überschüssigen Baryum befreite Filtrat wird wie bei dem Verfahren von *A. Neumann*[1]) mit 60 cm^3 5%iger Ammoniumnitratlösung auf 60—70° erwärmt und mit Überschuß von Ammoniummolybdatlösung versetzt. Nach dem Abkühlen wird durch ein mit 15%iger Ammoniumnitratlösung befeuchtetes Filter filtriert und mit eiskaltem Wasser ausgewaschen, bis das Waschwasser neutral reagiert. Der Niederschlag wird in einer gemessenen Menge $\frac{1}{2}$ n-Natronlauge (etwa 2 cm^3 Überschuß) gelöst, gekocht, bis alles Ammoniak vertrieben ist und dann mit $\frac{1}{10}$ n-Salzsäure titriert (Phenolphtalein als Indikator). 1 cm^3 $\frac{1}{10}$ n-Natronlauge entspricht 0·2536 *g* P_2O_5 oder 0·11075 *g* P.

Zu S. 425. Zur Bestimmung des **Arsens** verfährt man je nach den Mengen verschieden. Handelt es sich um größere Arsenmengen (von mindestens einigen Milligrammen), so zerstört man die organische Substanz mit Salzsäure und Kaliumchlorat wie oben beschrieben (S. 1066) und fällt das Arsen nach Vertreiben des überschüssigen Chlors durch mehrmaliges Einleiten von Schwefelwasserstoff in der Wärme; dieses Einleiten von Schwefelwasserstoff muß so lange fortgesetzt werden, bis in der vorher filtrierten Lösung kein Niederschlag mehr erscheint. Da nun bei phosphorhaltigen organischen Substanzen (z. B. Harn) durch Schwefelwasserstoff auch Phosphorverbindungen (die durch Chlor nicht völlig zerstört wurden) mit ausgefällt werden und diese bei der Arsenbestimmung ein viel zu hohes Resultat verursachen würden, so ist es notwendig, den ursprünglichen Schwefelwasserstoffniederschlag noch einmal besonders zu behandeln, um das Arsen vom Phosphor zu trennen. Zu diesem Zweck wird der auf einem Filter gesammelte Sulfidniederschlag mit warmem

[1]) *A. Neumann*, Einfache Veraschungsmethode (Säuregemischveraschung) und vereinfachte Bestimmung von Eisen, Phosphorsäure, Salzsäure und anderen Aschenbestandteilen unter Benutzung dieser Säuregemischveraschung. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. **37** (1902). 115.

Ammoniak gelöst und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Alsdann wird mehrmals rauchende Salpetersäure hinzugefügt und damit abgedampft, um die organische Substanz zu zerstören. Schließlich wird der Rückstand mit etwas Ammoniak aufgenommen, in einen Erlenmeyerkolben gespült, mit Salzsäure angesäuert und nun in der Wärme durch wiederholtes Einleiten von Schwefelwasserstoff das Arsen (dieses Mal ohne Phosphor) gefällt.

Das nach längerem Stehen abfiltrierte Schwefelarsen wird in Ammoniak gelöst, die Lösung in einer Schale zur Trockne verdampft und mit Salpetersäure ebenso behandelt wie das erstemal, jetzt um alles Arsen zu Arsensäure zu oxydieren. Der Rückstand wird mit Ammoniak aufgenommen, in ein Becherglas gespült, mit Magnesiamixtur und Alkohol (etwa der Hälfte der wässerigen Lösung) versetzt und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tage gießt man die Lösung durch ein Filter, löst den Magnesianiederschlag in möglichst wenig warmer, verdünnter Salzsäure, indem man das Becherglas wiederholt damit ausspült und die Lösung durch das Filter gibt. Das Filtrat wird mit starkem Ammoniak alkalisch gemacht, mit 5—10 cm^3 Magnesiamixtur und mit Alkohol (etwa der Hälfte des Volumens) versetzt. Am nächsten Tag wird der Magnesiumammoniumarseniat-Niederschlag in einem *Gooch*schen Tiegel abfiltriert, mit verdünntem alkoholischen Ammoniak (1 Teil 10%iges Ammoniak + 2 Teile Alkohol + 3 Teile Wasser) ausgewaschen, getrocknet und unter Einsetzen in einen größeren Porzellantiegel mit aufgelegtem Deckel anfangs gelinde, schließlich im Gebläse geglüht. Auf diese Weise kommt der Niederschlag als Magnesiumpyroarseniat ($Mg_2As_2O_7$) zur Wägung: 1 Gewichtsteil dieses Niederschlages entspricht 0·6375 Teilen As_2O_3 oder 0·4829 Teilen As.

Bei sehr kleinen Arsenmengen (1 *mg* und darunter) ist die Fällung mit Schwefelwasserstoff und Bestimmung als Magnesiumsalz nicht möglich. In solchen Fällen wendet man am besten das von *G. Lockemann* angegebene Verfahren an (s. oben S. 1074 u. f.). Die organische Substanz wird durch das Salpeterschmelzverfahren zerstört, und in der neutralisierten, abgekühlten Lösung wird das Arsen durch Adsorption mit Eisenhydroxyd gefällt. Die in 20%iger Schwefelsäure zu einem bestimmten Volumen gelösten Arsen-Eisenniederschläge werden portionsweise im *Marsh*schen Apparat geprüft, indem man $\frac{1}{100}$ oder $\frac{1}{10}$ oder $\frac{1}{4}$ usw. der Gesamtlösung untersucht. Die erhaltenen Arsenspiegel vergleicht man dann mit Spiegeln einer mit abgemessenen Arsenmengen hergestellten Normalskala.[1]) Am besten lassen sich die ganz kleinen Arsenmengen, etwa bis zu 0·010—0·015 *mg* = 10—15 *mmg* (Milliogramm) As, schätzen. Es ist daher ratsam, von den Eisenlösungen nur so viel für die Prüfung im *Marsh*schen Apparat zu verwenden, daß die Arsenspiegel unterhalb dieser Grenze bleiben. Notigen-

[1]) Abbildung einer solchen Normalskala bei *G. Lockemann*, Über den Arsennachweis mit dem *Marsh*schen Apparate. Zeitschr. f. angewandte Chemie. 18 (1905), zwischen Seite 424—425.

falls ist ein Teil der Eisenlösung noch mit 20%iger Schwefelsäure auf das 10- oder 100fache zu verdünnen. Wenn man dann mehrere Proben mit verschiedenen Mengen prüft und jeden so erhaltenen Arsenspiegel für sich durch Vergleich mit den Normalspiegeln wertet, so erhält man durch entsprechende Umrechnung auf das Ganze Zahlen, deren Mittelwert dann den wirklichen Arsengehalt der Lösung mit ziemlicher Genauigkeit angibt.

Zu S. 426. Für die **Quecksilber**bestimmung schlägt neuerdings *C. Siebert*[1]) ein Verfahren vor, bei dem im Gegensatz zu den früher von verschiedenen Seiten angegebenen, auf der Amalgamierung von Metallen beruhenden Methoden das Quecksilber als Sulfid zur Wägung kommt. Die Zerstörung der organischen Substanz wird entweder mit Salzsäure und Kaliumchlorat oder nach dem *Neumann*schen Verfahren ausgeführt. Zur Quecksilberbestimmung im Harn wird z. B. der Zerstörungsrückstand vom *Neumann*schen Verfahren vorsichtig mit Wasser verdünnt und zum Verjagen der Salpeterdämpfe gekocht. Unter Kühlung wird dann starkes Ammoniak (triplex) bis zur stark alkalischen Reaktion hinzugefügt und darauf mit Salzsäure angesäuert (Lackmuspapier). Nachdem nun die salzsaure Lösung zur Abscheidung von Kieselsäure (aus den Gefäßen) 20 Minuten gekocht hat, läßt man einen Tag stehen, filtriert und wäscht mit heißem Wasser aus. Bei mäßiger Wärme wird dann 20 Minuten lang Schwefelwasserstoff eingeleitet; bei sehr wenig Quecksilber entsteht nur eine gelbe, kolloidale Lösung des Sulfids, das sich dann aber beim weiteren Erwärmen (bis zum Verjagen des Schwefelwasserstoffs) ausscheidet. Nach Absitzen des Niederschlages wird durch einen *Gooch*schen Tiegel filtriert, mit heißem Wasser und schließlich mit Alkohol nachgewaschen. Der überschüssige Schwefel wird mit Schwefelkohlenstoff herausgelöst, dieser mit Alkohol und Äther ausgewaschen; der Niederschlag bei 100—110° getrocknet und schließlich gewogen. 1 Teil des Quecksilbersulfidniederschlags entspricht 0·8617 Teilen Quecksilber.

Die Quecksilberbestimmung in Fäces führt man in der Weise aus, daß man eine gewogene Fäcesmenge mit Alkohol verreibt, auf dem Wasserbade abdampft und dieses nochmals wiederholt, bis ein trockenes Pulver zurückbleibt, das dann beliebig lange haltbar ist. Eine gewogene Menge dieses trockenen Fäcespulvers wird mit der doppelten Menge Wasser verrührt und vorsichtig mit rauchender Salpetersäure versetzt, bis alles gelöst ist. Diese Lösung wird dann mit Schwefelsäure-Salpetersäuremischung nach *Neumann* behandelt und im übrigen weiter so verfahren wie beim Harn. Die Fehler dieser Bestimmungsmethode bewegen sich in Zehntelmilligrammen.

Zu S. 427. Für die **Fluor**bestimmung läßt sich das von *G. Tammann*[2]) angegebene Verfahren benutzen. Die Substanz wird in der oben (s. S. 1065)

[1]) *Conrad Siebert,* Über die Bestimmung des Quecksilbers im Harn und Fäces. Biochem. Zeitschr. **25** (1910). 328.

[2]) *G. Tammann,* Über das Vorkommen des Fluors in Organismen. Zeitschr. f. physiolog. Chemie. **12** (1888). 322.

beschriebenen Weise behandelt. Die in der Vorlage bzw. in dem Ableitungsrohr gebildete Kieselsäure wird durch Kalilauge herausgespült und mit der alles Fluor enthaltenden Flüssigkeit zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit Salzsäure aufgenommen, das gebildete Kaliumsilicofluorid wird mit Alkohol gefällt, nach einigem Stehen filtriert, gewaschen und mit $\frac{1}{10}$n-Kalilauge titriert.

Beim einfachen Einäschern der organischen Stoffe entweicht das Fluor. Auch bei Zusatz der 60fachen Menge Natriumkarbonat ist ein Verlust von 10% F zu erwarten.

Daher dürfte in vielen Fällen die Methode von *Lenz-Deußen*[1]) empfehlenswert sein, bei der das Fluor nicht entweichen kann, sondern durch überschüssigen Kalk in Calciumfluorid übergeführt und als solches gewogen wird. In einem Platintiegel von der Größe eines Fingerhuts wird die abgewogene Substanz mit reinem Calciumoxyd vermischt und der Tiegel wird mit Calciumoxyd bis oben angefüllt. Ein zweiter größerer Platintiegel wird umgekehrt darüber gestülpt und das Ganze dann umgekehrt, so daß der Boden des kleineren Tiegels nach oben weist. Der Zwischenraum wird ebenfalls mit Calciumoxyd bis fast an den Rand des äußeren Tiegels angefüllt. Mittelst eines Ringbrenners erhitzt man die Tiegel allmählich bis zur beginnenden Rotglut. Nach dem Erkalten bringt man den Tiegelinhalt in ein Becherglas von etwa 1 Liter Inhalt, löscht mit Wasser vorsichtig ab und gibt so lange verdünnte Essigsäure hinzu, bis keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Alsdann wird etwa ein Zehntel des Volumens Alkohol zugesetzt, nach mehrstündigem Stehen das Calciumfluorid abfiltriert und mit alkoholhaltiger verdünnter Essigsäure so lange ausgewaschen, bis das Filtrat mit Ammoniumoxalat keinen sofort auftretenden Niederschlag mehr gibt. Das Calciumfluorid wird auf dem Filter getrocknet, in einem Platintiegel bei gelinder Rotglut geglüht und dann zur Wägung gebracht. Zur Kontrolle führt man es in Calciumsulfat über und wägt noch einmal.

Zu S. 428. Für die kolorimetrische Bestimmung von **Jod** neben Brom ist das Jod durch eines der im qualitativen Teil (s. S. 1065) angegebenen Reagenzien, welche die Bromide nicht angreifen, in Freiheit zu setzen. Chlorwasser ist für diesen Zweck auf jeden Fall zu vermeiden.

---

[1]) *E. Deußen,* Eine neue quantitative Bestimmung des Fluors und über die Zusammensetzung des Eisenfluorids. Wiener Monatshefte. **1907.** S. 1145.

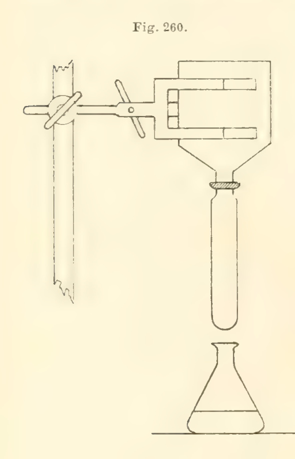
Ultrafiltration.

Von **H. Bechhold,** Frankfurt a. M.

Ultrafiltration nennt man die Filtration durch Gallertfilter. Sie dient zur Trennung der Kolloidlösungen von Wasser und Kristalloiden, sowie zur Scheidung von Kolloidgemischen verschiedener Teilchengröße. Bei Kenntnis der Porengröße der Ultrafilter gibt die Ultrafiltration auch Auskunft über die Teilchengröße der untersuchten Kolloide.

Ultrafilter. Zur Ultrafiltration kann man sackartige Membranen benutzen, welche man sich aus Kollodium anfertigt. Dieselben müssen stets feucht sein und feucht aufbewahrt werden. Man gießt z. B. über einen Glaszylinder mit kugeligem Boden Kollodium in gleichmäßiger Schicht auf, läßt unter ständiger Drehung abtropfen, bis sich oberflächlich eine dünne feste Oberhaut gebildet hat. Dann taucht man rasch in Wasser, wodurch das Kollodium gelatiniert. Nachdem der größte Teil des Lösungsmittels (Alkohol-Äther) sich im Wasser gelöst hat (je nach Dicke der Schicht Minuten bis Stunden), kann man den Sack von der Glasunterlage lostrennen. Zu dem Zweck führt man in der gewünschten Höhe einen scharfen Schnitt rings um die Peripherie, stülpt den Rand vorsichtig um, indem man wiederholt mit Wasser benetzt und zieht gewissermaßen „die Haut über die Ohren" ab. Für kleine Ultrafilter lassen sich Reagenzröhren als Glasunterlage verwenden; doch kann man bei Benutzung größerer Glaszylinder auch Säcke von 6 *cm* Durchmesser und mehr herstellen. Statt das Kollodium auf die äußere Fläche eines Glaszylinders zu gießen, kann man auch einen Hohlkörper, z. B. ein Reagenzglas, einen Kolben etc., damit ausschwenken. Die weitere Behandlung ist die gleiche. Zur Loslösung der Haut von der Glasunterlage gehört in beiden Fällen eine gewisse Geschicklichkeit.

Fig. 260.



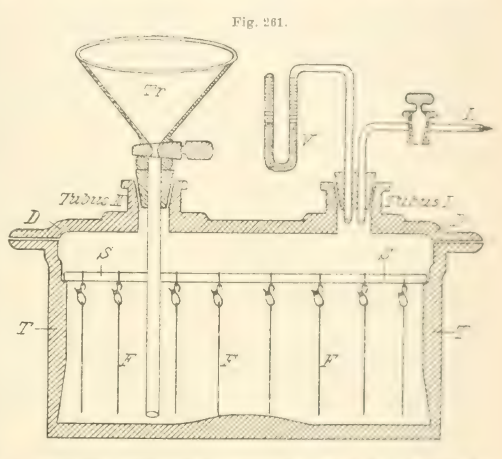
Sackartiges Ultrafilter nach *Schoep.*

Zur Anwendung dieser Säcke werden sie an ihrem oberen Ende innen oder außen über einen Ring gezogen (Glas, Holz oder dgl.), mit Bindfaden oder Seide vorsichtig daran festgebunden. Der Ring wird in einem Stativ befestigt und der Sack ist nun gebrauchsfertig (vgl. Fig. 260). *Schoep*[1]) hat durch Zusatz von Glyzerin und Rizinusöl zu dem Kollodium die Durchlässigkeit der Membranen erhöht, was besonders für die Filtration anorganischer Kolloide von Bedeutung ist.

Die geschilderte Art von Ultrafiltern wird besonders in Frankreich angewandt (*Malfitano, Duclaux*), doch ist ihre Leistung nur eine geringe. Die Filtration erfolgt sehr langsam (wenige Kubikzentimeter in einer Stunde), auch halten sie nur sehr geringen Druck aus, so daß ihre Anwendbarkeit äußerst beschränkt ist.

H. Bechhold[2]) verwendet als Ultrafilter flache Scheiben aus Filtrierpapier, die mit einer Gallerte imprägniert sind. Durch diese Papierunterlage gewinnen die Filter eine große Festigkeit und können im *Bechhold*schen Ultrafiltrationsapparat unter Umständen Drucke von 20 Atmosphären und mehr aushalten. Da *Bechhold* fand, daß die Durchlässigkeit bzw. Dichte der Ultrafilter abhängig ist von der Konzentration der zur Herstellung benutzten Gallerte, so ist nach *Bechhold* die Möglichkeit geboten, Filter von jeder gewünschten Porenweite herzustellen. Die Filter können käuflich bezogen werden.[3])

Fig. 261.



Glastrog zur Herstellung von Ultrafiltern im Vacuum nach *Bechhold*.

Da es jedoch in manchen Fällen erwünscht sein könnte, die Filter selbst anzufertigen, so sei die Herstellung hier kurz beschrieben.[4])

---

[1]) Bull. de la Soc. chim. de Belgique. **24** (1910). Nr. 10.

[2]) *H. Bechhold*, Kolloidstudien mit der Filtrationsmethode. Zeitschr. f. phys. Chem. **60** (1907). 257—318; Die Gallertfiltration (Ultrafiltration). Kolloidzeitschr. 2. H. 1 u. 2; Ultrafiltration. Biochem. Zeitschr. **6**. H. 5/6.

[3]) *Schleicher & Schüll* in Düren (Rheinland) versenden *Bechhold*sche Ultrafilter in Packungen von 10 Stück (Durchmesser 9 *cm*) in Aluminiumdosen, die mit Wasser gefüllt und durch Gummiring verschlossen sind; die Firma führt 6 Sorten von verschiedener Dichte auf Lager.

[4]) Ausführlich bei *Bechhold*, l. c.

Als Filterpapier erwiesen sich am zweckmäßigsten die Sorten Nr. 566 und Nr. 575 von *Schleicher & Schüll.* Diese werden in Scheiben von 9 *cm* Durchmesser geschnitten und nach Entfernung aller Luft im Vakuum unter Atmosphärendruck mit der Gallerte imprägniert. Dies geschieht in einem Glastrog[1]) (Fig. 261).

Auf dem rechteckigen Trog *T* ist der Deckel *D* luftdicht aufgeschliffen. An der Querstange *S* sind eine Anzahl Filterscheiben *F* aufgehängt. Der Deckel *D* hat 2 Tuben. Durch Tubus *I* gehen 2 Röhren, die eine führt nach der Luftpumpe *L*, die andere zum Vakuummeter *V*. Ist die Luft aus dem Trog entfernt, so läßt man durch den mit Hahn versehenen Trichter *Tr*, dessen Rohr bis auf den Boden führt, die Gallertflüssigkeit eintreten, bis sie die Filter bedeckt, schließt den Hahn zum Trichter und öffnet den Hahn, durch den ursprünglich die Luft ausgepumpt wurde; so wird die Gallertflüssigkeit unter Atmosphärendruck in die Filter gepreßt. Nach einiger Zeit (bei niederen Konzentrationen 10—20 Minuten, bei hohen Konzentrationen 1—2 Stunden) nimmt man den Deckel ab, hebt die Stange mit den Filtern aus der Flüssigkeit und läßt unter ständig drehender Bewegung jedes einzelnen Filters abtropfen. Schließlich gelatiniert man rasch das ganze Filter, indem man es in eine geeignete Flüssigkeit taucht. Bei Eisessigkollodium genügt Wasser; arbeitet man mit Gelatine, so muß der ganze Imprägniertrog in einem Bad mit lauem Wasser stehen. Die Härtung der Gelatinefilter erfolgt derart, daß man die an der Luft gelatinierten, noch feuchten Filter in eine mit Eis gekühlte, 2—4%ige Formaldehydlösung taucht und einige Zeit im Eisschrank stehen läßt.

Die Filter, auf welche Art sie immer gewonnen sein mögen, werden dann mehrere Tage in fließendem Wasser gewaschen und in Wasser aufgehoben, dem man etwas Chloroform zusetzt, um Schimmelbildung zu unterdrücken.

Bechhold verwendet meist Eisessigkollodium (Lösung von Kollodiumwolle in Eisessig[2]). Die Lösungen können durch Verdünnen mit Eisessig auf jede gewünschte Dichte gebracht werden.

Sollen nicht wässerige Lösungen (z. B. in Benzol, Alkohol etc.) ultrafiltriert werden, so muß man das Wasser in den Filtern sukzessive durch das Lösungsmittel verdrängen. (Man verdrängt z. B. erst das Wasser durch Azeton, dieses dann durch Benzol usf.)

Der Ultrafiltrationsapparat.

Sehr poröse Filter sind bei geringem Druck durchlässig und können dann in ähnlicher Weise wie jedes andere Filter benutzt werden. Bei dichteren Filtern muß jedoch ein Druck von über einer bis

[1]) Zu beziehen von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin.

[2]) Die Chemische Fabrik auf Aktien (vorm. *Schering*), Berlin, liefert auf Bestellung Lösungen mit einem Gehalt von 10% Kollodiumwolle und 2½% Kaliumcarbonic., welche sich durch ihre geringe Kontraktion beim Gelatinieren auszeichnen.

zu 20 Atmosphären ausgeübt werden, um überhaupt ein Filtrat zu erlangen. Zu diesem Zweck hat *Bechhold* einen Apparat konstruiert, der in Fig. 262, 263 und 264 wiedergegeben [1]) ist; Fig. 262 und 263 eignen sich mehr für mittlere, Fig. 264 für sehr hohe Drucke. Apparat Fig. 262 besteht aus einem zylindrischen Gefäß *H*, in dem der eigentliche Trichter *Tr* aufsitzt. Zwischen die unteren Ausbuchtungen von *Tr* und *H* werden die runden Filterscheiben *Fi* gepreßt. Die Dichtung erfolgt durch zwei Gummiringe *GG*. Zum Schutz gegen das Reißen eines Filters liegt dasselbe auf einem Nickeldrahtnetz oder einer mit vielen Löchern versehenen vernickelten Platte *N* auf und ist gegen zu starke Ausbuchtung bei Druck nochmals durch die mit mehreren großen Löchern durchsetzte Platte *P*

Fig. 262.

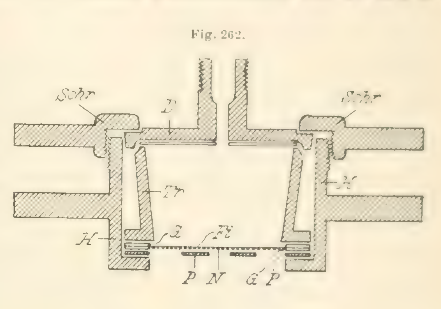
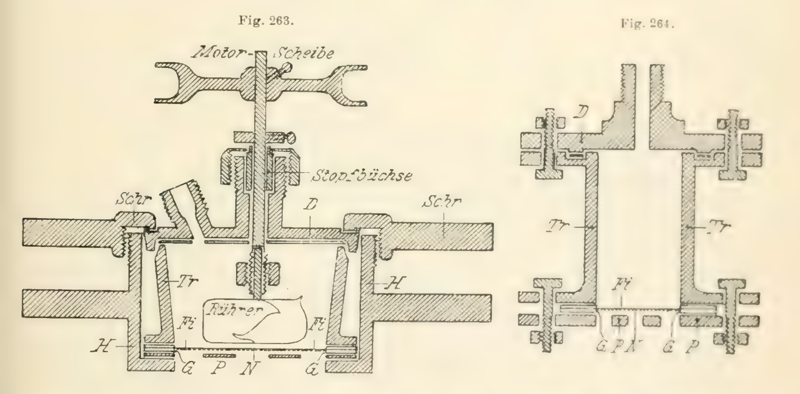


Fig. 263. Fig. 264.

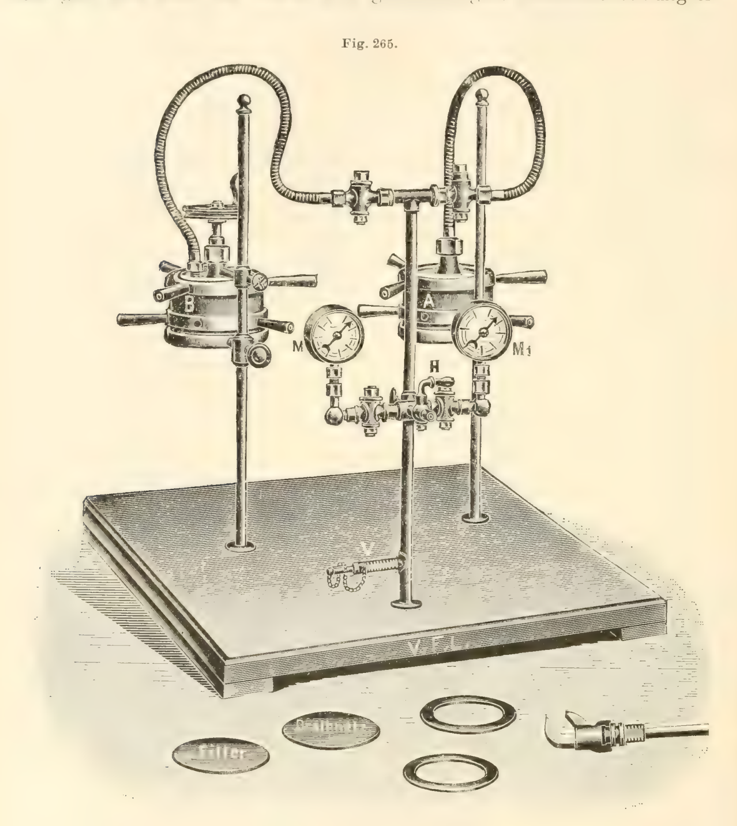


geschützt. Der Trichter *Tr* ist oben konisch abgedreht und wird durch den Dekel *D* mit Konusverschluß und Gummidichtung abgeschlossen. Durch Andrehen des Schraubenverschlusses *Schr* wird sowohl der Deckel oben als auch das Filter unten mit einer Handbewegung dicht verschlossen. Durch den Deckel führt ein kleiner Ansatz mit Schraubenwindung, an dem das Rohr zum Druckgefäß befestigt wird. — Fig. 264, hauptsächlich für Drucke über 10 Atmosphären, hat Flanschenverschluß; dies ist natürlich etwas

[1]) Alle diese Apparate werden hergestellt von den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin, Scharnhorststraße.

umständlicher. Da in Fig. 264 die entsprechenden Buchstabenbezeichnungen wie in Fig. 262 gewählt sind, so erübrigt eine besondere Beschreibung. — Fig. 263 zeigt den Apparat mit Rührer, der in den meisten Fällen dem ohne Rührer vorzuziehen ist, da die Filtration ungleich rascher vor sich geht und auch das Filtrat eine gleichmäßigere Zusammensetzung er-

Fig. 265.



Ultrafiltrationsapparat nach *Bechhold*.

hält. Bei Unterlassung einer Rührung können sich Gelschichten auf dem Ultrafilter absetzen, die ihrerseits wieder als Filter wirken. Allerdings erfordern die Vorbereitungen, nämlich die Dichtung der Stopfbüchse gegen hohen Druck, große Sorgfalt. In diesem Apparat erfolgt die Zuführung des Druckes durch einen seitlichen Ansatz.

Der Druck.

Der Druck kann durch eine Handluftpumpe zugeführt werden. Dies Verfahren eignet sich besonders bei wissenschaftlichen Untersuchungen über die Filterwirkung, kurz, wo es sich um die Messung sehr feiner Abstufungen des Druckes handelt und wo keine lange Druckwirkung gefordert wird. Bei praktischen Ultrafiltrationen wird man einen Stahlzylinder mit Preßluft, komprimiertem Stickstoff, Kohlensäure oder dgl. vorziehen. Zwischen Stahlzylinder und Ultrafiltrationsapparat müssen ein Reduzierventil und zwei Manometer *M* geschaltet sein; das eine (für sehr hohe Drucke) soll den Druck im Stahlzylinder anzeigen, das andere, hinter dem Reduzierventil, den niederen Druck im Ultrafiltrationsapparat. Durch ein weiteres Reduzierventil nebst entsprechendem Manometer ließen sich übrigens meines Erachtens so feine Druckdifferenzen einstellen, daß sich diese Anordnung auch statt der Handluftpumpe für wissenschaftliche Messungen verwenden ließe.

Fig. 265, welche den zusammengestellten Apparat zeigt, weist noch einen Hahn *H* auf, der den Zweck hat, den Druck plötzlich abzulassen und so die Ultrafiltration zu unterbrechen.

Die Eichung des Ultrafilters.

In vielen Fällen ist es wertvoll, einen Maßstab für die Leistung des Ultrafilters zu besitzen, da sich hieraus Rückschlüsse über Teilchengröße des untersuchten Kolloids ergeben.

Hierzu eignen sich 3 Methoden:

1. Hämoglobinmethode. Man stellt sich eine 1%ige Hämoglobinlösung (Haemoglobin. in lamellis Merck) her und sieht zu, ob das in Frage kommende Filter Hämoglobin durchläßt oder nicht. Hält es dieses zurück, so ist es auch undurchlässig für die meisten anorganischen Kolloide (mit Ausnahme von frischer Kieselsäure). Den Grad der Durchlässigkeit für Hämoglobin erkennt man aus der mehr oder minder starken Rotfärbung des Filtrats.

Für die Durchlässigkeit von Ultrafiltern hat *Bechhold* nachstehende Tabelle aufgestellt, welche die abnehmende Teilchengröße von Kolloiden in Lösung darstellt und auf Grund von Ultrafiltrationen mit Ultrafiltern von verschiedener Porenweite gewonnen ist.

Suspensionen.
Berlinerblau.
Platinsol (nach *Bredig*).
Kolloides Eisenoxyd.
Kaseïn (in Milch).
Kolloides Arsensulfid.
Goldlösung *(Zsigmondy)* Nr. 4 (ca. 40 μμ).
Bismon (koll. Wismutoxyd nach *Paal*).
Lysargin (koll. Silber nach *Paal*).
Kollargol (koll. Silber von *Heyden*) (ca. 20 μμ).
Goldlösung *(Zsigmondy)* Nr. 0 (ca. 1 bis 4 μμ).
1%ige Gelatinelösung.
1%ige Hämoglobinlösung (Mol.-Gew. ca. 16.000).
Serumalbumin (Mol.-Gew. ca. 5000 bis 15.000).
Diphtherietoxin.
Protalbumosen.
Kolloide Kieselsäure.
Lysalbinsäure.
Deuteroalbumosen *A*.
Deuteroalbumosen *B* (Mol.-Gew. zirka 2400).
Deuteroalbumosen *C*.
Lackmus.
Dextrin (Mol.-Gew. ca. 965).
Kristalloide.

2. Luftdurchblasmethode.[1]) Diese Methode gestattet die Ermittlung von angenäherten absoluten Werten für die größten Poren eines Ultrafilters. Sie beruht auf folgendem Prinzip: Um durch eine Kapillare, die in Wasser taucht und vollkommen benetzt wird, Luft zu pressen, ist ein gewisser Druck erforderlich, der abhängig ist von der Oberflächenspannung von Wasser gegen Luft, also einer Konstanten, und dem Radius der Kapillare.

Wenn D der Durchmesser der Kapillare ist, p der Druck in Atmosphären und β die Kapillaritätskonstante, so gilt folgende Formel:

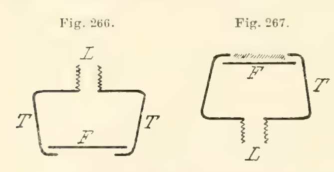
$$D = \frac{4\,\beta}{p\,.\,1{\cdot}033.10^5}.$$

Setzt man β = 7·7 bei 18°, so erhält man

$$D = \frac{30{\cdot}8}{p\,.\,1{\cdot}033.10^5}.$$

Auf Grund dieser Formel kann man aus dem Maximaldruck, der erforderlich ist, um Luft durch die Poren der vollkommen nassen Filter zu pressen, den kleinsten Durchmesser der betreffenden Poren ermitteln.

Die praktische Durchführung des Versuches gestaltet sich in der Weise, daß man den Filtrierapparat umdreht, eine dünne Schicht Wasser auf das Filter bringt (einige Millimeter hoch) und beobachtet, bei welchem höchsten Druck Luftblasen zu entweichen beginnen. Die schematische Skizze Fig. 266 zeigt den Filtrierapparat in normaler Lage (T = Trichter, F = Ultrafilter, L = Lufteintritt). Fig. 267 zeigt ihn in der Lage zum Durchpressen von Luft; über dem Filter befindet sich eine dünne Wasserschicht.



Nach dieser Methode ermittelt, besaßen die größten Poren eines Filters, das gerade Hämoglobin zurückhielt, 50—99 μμ Durchmesser.

3. Methode der Durchflußgeschwindigkeit von Wasser. Diese Methode gestattet die Ermittlung von angenäherten absoluten Werten für den mittleren Porendurchmesser von Ultrafiltern. Die Methode beruht auf dem etwas umgeformten *Poiseuille*schen Gesetz für den Durchfluß von Flüssigkeiten durch kapillare Röhren.[2])

D = Porendurchmesser, Q = Durchflußmenge von Wasser durch die Oberfläche F, bei konstantem Druck S. — R ist das Verhältnis der leeren (wasserhaltigen) Räume zu den festen; es ergibt sich aus dem Prozentgehalt der Gallerten an fester Substanz (ein 5%iges Filter enthält auf 5 volle 95 leere Räume). L ist die Länge der Kapillaren (d.h. nicht kleiner

[1]) *Bechhold,* Durchlässigkeit von Ultrafiltern. Zeitschr. f. phys. Chem. **64** (1908). 328—342. — Bei praktischen Versuchen nach Methode 2 und 3 ist jedenfalls diese Arbeit vorher nachzusehen, da sich die Einzelheiten der Methodik nicht in aller Kürze wiedergeben lassen.

[2]) *Bechhold,* l. c.

als die Dicke des nassen Filters). k ist ein konstanter Faktor, abhängig von Temperatur und Art der Flüssigkeit. Dann gilt die Formel:

$$D = \frac{Q\,(R + 1)\,L}{k\,.\,S\,.\,F\,.\,R}.$$

Richtet man es ein, daß alle Versuche unter gleichen Bedingungen vorgenommen werden, so vereinfacht sich die Formel, indem $\frac{L}{k\,.\,S\,.\,F}$ eine Konstante wird.

Zur praktischen Durchführung sind 2 Personen erforderlich: die eine muß den Druck regeln, die andere in gleichen Zeiten (mit Stopuhr) das filtrierte Wasser bestimmen. Unter den Apparat wird ein Trichter gesetzt, dessen Abfluß durch Gummirohr und Quetschhahn verschließbar ist.

Den Ultrafiltrationsapparat füllt man mit Wasser, läßt Druckluft zu bis ein bestimmter Druck erreicht ist. In diesem Moment schließt man den Quetschhahn unter dem Trichter so, daß alles Wasser, welches bei konstantem Druck filtriert, im Trichter aufgefangen wird. Sobald eine bestimmte Zeit (z. B. eine Minute) abgelaufen ist, muß sofort der gesamte Druck abgelassen werden. — Auf diese Weise mißt man, wieviel Wasser in einer bestimmten Zeit durch ein bestimmtes Filter filtriert. Hat man vorher den gleichen Versuch mit einem Filterpapier gemacht, dessen Porengröße bekannt ist, das z. B. Blutkörperchen oder Bakterien, die mikroskopisch meßbar sind, gerade teilweise zurückhält, so kann man auf Grund der erwähnten Formel die mittlere Porenweite des Ultrafilters berechnen.

Auf Grund dieser Methode zeigten Ultrafilter, welche Hämoglobin gerade zurückhielten, einen mittleren Porendurchmesser von 30—36 $\mu\mu$.

Adsorption des Filters.

Bei Ultrafiltrationsversuchen ist darauf zu achten, ob nicht das Ultrafilter durch Adsorption zu Störungen Veranlassung gibt. Es empfiehlt sich deshalb in einem Vorversuch die zu prüfende Lösung mit einem zerschnittenen Filter zu schütteln und sie dann zu untersuchen. Ist der Gehalt nach dem Schütteln der gleiche oder fast der gleiche, so tritt keine Adsorption auf. Wird der Ultrafiltrationsversuch durch Adsorption gefälscht, so empfiehlt es sich, eine andere Gallerte zur Ultrafiltration zu verwenden.

Während z. B. Arachnolysin durch Eisessigkollodium sehr stark adsorbiert wird, wird es durch Formolgelatine sehr wenig adsorbiert.

Auf alle Fälle empfiehlt es sich, bei Ultrafiltrationsversuchen quantitativ zu arbeiten und sowohl am Filterrückstand wie am Filtrat die Veränderungen zu prüfen, die durch den Versuch erzielt wurden.

Ultrafiltrationen bei höherer Temperatur.

Umgibt man den Trichter mit einem weiten Blechmantel, der die entsprechenden Durchlässe besitzt, so kann man auch bei höherer Temperatur ultrafiltrieren. Den Blechmantel erhitze ich seitlich durch einen Bunsenbrenner in der Art wie einen Heißwassertrichter.

Anwendung der Ultrafiltration.

Die Ultrafiltration dient, wie bereits eingangs erwähnt, zur Trennung der Kolloide von Kristalloiden. Sie kann also in vielen Fällen die Dialyse ersetzen. Vor dieser hat sie den Vorzug eines weit rascheren Arbeitens und erlaubt die Trennung ohne die bei der Dialyse unvermeidliche starke Verdünnung des Dialysats.

In dieser Richtung wurde sie angewandt zur Trennung von Globulin und den es in Lösung haltenden Elektrolyten, der Verdauungsprodukte des Kasein durch Pankreatin (*Bechhold*[1]).

Das wichtigste neue Anwendungsgebiet der Ultrafiltration besteht darin, daß sie die Trennung von Kolloiden verschiedener Teilchengröße gestattet (fraktionierte Ultrafiltration) oder von solchen Stoffen, über deren kristalloide bzw. kolloide Natur man noch im Unklaren ist. Es sei hier verwiesen auf die Trennung der verschiedenen Albumosen durch *Bechhold*[1]), die Studien über die Natur der Stärkelösungen durch *Fouard*[2]), die Versuche zur Aufklärung des zellfreien Gärungsprozesses durch *A. v. Lebedew.*[3])

Unveröffentlicht sind noch die Untersuchungen von *Grosser* über Milch sowie die Trennung des Diphtherietoxins vom Toxon durch *Bechhold.*

Grosser gelang durch Ultrafiltration ein einfacher Nachweis zur Unterscheidung von gekochter und ungekochter Milch.

Von besonderer Wichtigkeit ist die Ultrafiltration für das Studium von Gleichgewichten in Lösungen, da bei dieser Methode keinerlei Änderung im Gleichgewicht zwischen den kristalloiden und kolloiden Bestandteilen durch Verdünnung der Lösung vor sich geht. Voraussetzung ist natürlich, daß man nur kleine Mengen filtriert (gewissermaßen das Differential bestimmt), so daß keine Konzentrationsänderungen auftreten. Darauf beruhen die zahlreichen Untersuchungen über das Eisenoxydhydrosol von *Duclaux* und *Malfitano.*

Für die Lösung rein biologischer Fragen wurde die Ultrafiltration schon verschiedentlich herangezogen. So von *Burian*[4]) zum Studium der Funktion der Nierenglomeruli von *Bechhold*[5]) für das Problem der „Inneren Antisepsis" und der Pulsationen bei den Sekretionen.[6])

Schließlich sei noch erwähnt, daß man durch Ultrafiltration keimfreie Flüssigkeiten erhalten kann und ein optisch leeres Wasser, das sich zu ultramikroskopischen Zwecken eignet *(Bechhold).*

Die Frage der Verwendung von Ultrafiltern zum Studium des „filtrierbaren Virus" wurde auf der 5. Tagung d. fr. Verein. f. Mikrobiologie[7]) (Dresden 1911) diskutiert *(Doerr).*

---

[1]) l. c.

[2]) Compt. rend. **146**. 317, 318; **146**. 978/981; **147**. 813/816; **147**. 931/933.

[3]) Biochem. Zeitschr. **20**. H. 1/2.

[4]) *Pflügers* Archiv d. Physiol. **136**. 741—760.

[5]) Zeitschr. f. phys. Chem. **52** (1907). 177—180.

[6]) *Van Bemmelens* Festschrift. 1910.

[7]) Centralbl. f. Bakteriol. 1. Abt. Beilage Bd. **50** (1911).

Tabellen zur Herstellung von Lösungen mit bestimmter H·Ionenkonzentration.

Von **Peter Rona**, Berlin.

Wie in diesem Band, S. 317 auseinandergesetzt wurde, sind bei der kolorimetrischen Methode der Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration einer bestimmten Lösung Vergleichsflüssigkeiten mit genau bekannter Wasserstoffionenkonzentration anzuwenden, deren Farbe nach Zusatz eines passenden Indikators mit der Farbe der zu untersuchenden Lösung, mit demselben Indikator versetzt, verglichen wird. Um solche Lösungen von bestimmter H·Konzentration leicht darzustellen, schlägt *Sörensen* [1]) folgende Standardlösungen vor:

1. Eine 0·1 n-Salzsäure (in den Tabellen mit „HCl“ bezeichnet).

2. Eine 0·1 n-Natriumhydroxydlösung (in den Tabellen mit „NaOH“ bezeichnet).

3. Eine Lösung, die in einem Liter 7·505 Glykokoll und 5·85 *g* reines NaCl enthält. (In den Tabellen mit „Glykokoll“ bezeichnet.)

4. Eine Lösung, die 9·078 *g* KH_2PO_4 im Liter enthält, d. h. eine $^1/_{15}$ molare Lösung. (In den Tabellen mit „prim. Phosphat“ bezeichnet.)

5. Eine Lösung, die 11·876 *g* $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ im Liter enthält, d. h. eine $^1/_{15}$ molare Lösung. (In den Tabellen mit „sek. Phosphat“ bezeichnet.[2])

6. Eine 0·1 molare Lösung sekundären Natriumcitrats; diese wird durch Lösen von 21·008 *g* kristallisierter Zitronensäure in 200 *cm*³ n-Natronlösung und Verdünnen mit Wasser auf ein Liter hergestellt. (In den Tabellen als „Citrat“ bezeichnet.)

7. Eine alkalische Borsäurelösung, hergestellt durch Lösen von 0·2 mol. Borsäure (12·404 *g*) in 100 *cm*³ n-Natronlösung und Verdünnung mit Wasser auf ein Liter. (In den Tabellen als „Borat“ bezeichnet.)

Ausführliche Angaben über die genaue Herstellung dieser Lösungen finden sich in der erwähnten Arbeit von *Sörensen*. Die von *Kahlbaum* bezogenen garantiert reinen Reagenzien entsprechen den gestellten Anforderungen.

---

[1]) *S. P. L. Sörensen*, Enzymstudien. II. Biochem. Zeitschr. 21. 131 (1909).

[2]) Die in diesem Band, S. 317 gegebene Phosphatreihe bezieht sich auf solche $^1/_{15}$ molare Lösungen.

Glykokollmischungen.

Mischung	p_H	Mischung	p_H
10 cm^3 Glykokoll	ca. 6·106	10 cm^3 Glykokoll	ca. 6·106
9·9 " " + 0·1 cm^3 HCl	4·411	9·9 " " + 0·1 cm^3 Na OH . . .	7·809
9·75 " " + 0·25 " "	3·991	9·75 " " + 0·25 " " . . .	8·237
9·5 " " + 0·5 " "	3·679	9·5 " " + 0·5 " " . . .	8·575
9 " " + 1 " "	3·341	9 " " + 1 " " . . .	8·929
8 " " + 2 " "	2·922	8 " " + 2 " " . . .	9.364
7 " " + 3 " "	2·607	7 " " + 3 " " . . .	9·714
6 " " + 4 " "	2·279	6 " " + 4 " " . . .	10·140
5 " " + 5 " "	1·932	5·5 " " + 4·5 " " . . .	10·482
4 " " + 6 " "	1·645	5·1 " " + 4·9 " " . . .	11·067
3 " " + 7 " "	1·419	5 " " + 5 " " . . .	11·305
2 " " + 8 " "	1·251	4·9 " " + 5·1 " " . . .	11·565
1 " " + 9 " "	1·146	4·5 " " + 5·5 " " . . .	12·095
10 " "	1·038	4 " " + 6 " " . . .	12·399
		3 " " + 7 " " . . .	12.674
		2 " " + 8 " " . . .	12·856
		1 " " + 9 " " . . .	12·972
		10 " " . . .	13·066

Phosphatmischungen.

Mischung	p_H	Mischung	p_H
10 cm^3 sek. Phosphat	8·302	4 cm^3 sek. Phosphat + 6 cm^3 prim. Phosph.	6·643
9·9 " " " + 0·1 cm^3 prim. Phosph.	8·171	3 " " " + 7 " " "	6·468
9·75 " " " + 0·25 " " "	8·038	2 " " " + 8 " " "	6·239
9·5 " " " + 0·5 " " "	7·863	1 " " " + 9 " " "	5·910
9 " " " + 1·0 " " "	7·648	0·5 " " " + 9·5 " " "	5·600
8 " " " + 2 " " "	7·347	0·25 " " " + 9·75 " " "	5·305
7 " " " + 3 " " "	7·146	0·1 " " " + 9·9 " " "	4·976
6 " " " + 4 " " "	6·976	10 " " "	4·529
5 " " " + 5 " " "	6·813		

Citratmischungen.

	p_H
10 cm³ Citrat	4·958
9·5 „ „ + 0·5 cm³ HCl	4·887
9 „ „ + 1·0 „ „	4·830
8 „ „ + 2 „ „	4·652
7 „ „ + 3 „ „	4·447
6 „ „ + 4 „ „	4·158
5·5 „ „ + 4·5 „ „	3·948
5 „ „ + 5 „ „	3·692
4·75 „ „ + 5·25 „ „	3·529
4·5 „ „ + 5·5 „ „	3·364
4 „ „ + 6 „ „	2·972
3·33 „ „ + 6·67 „ „	2·274
3 „ „ + 7 „ „	1·925
2 „ „ + 8 „ „	1·418
1 „ „ + 9 „ „	1·173
10 „ „	1·038

	p_H
10 cm³ Citrat	4·958
9·5 „ „ + 0·5 cm³ Na OH	5·023
9 „ „ + 1 „ „	5·109
8 „ „ + 2 „ „	5·314
7 „ „ + 3 „ „	5·568
6 „ „ + 4 „ „	5·969
5·5 „ „ + 4·5 „ „	6·331
5·25 „ „ + 4·75 „ „	6·678
5 „ „ + 5 „ „	9·052—10·092
4·5 „ „ + 5·5 „ „	12·073
4 „ „ + 6 „ „	12·364

Boratmischungen.

	p_H
10 cm³ Borat	9·241
9·5 „ „ + 0·5 cm³ HCl	9·168
9 „ „ + 1 „ „	9·087
8·5 „ „ + 1·5 „ „	9·007
8 „ „ + 2 „ „	8·908
7·5 „ „ + 2·5 „ „	8·799
7 „ „ + 3 „ „	8·678
6·5 „ „ + 3·5 „ „	8·506
6 „ „ + 4 „ „	8·289
5·75 „ „ + 4·25 „ „	8·137
5·5 „ „ + 4·50 „ „	7·939
5·25 „ „ + 4·75 „ „	7·621
5 „ „ + 5 „ „	6·548
4·75 „ „ + 5·25 „ „	2·371

	p_H
10 cm³ Borat	9·241
9 „ „ + 1 cm³ NaOH	9·360
8 „ „ + 2 „ „	9·503
7 „ „ + 3 „ „	9·676
6 „ „ + 4 „ „	9·974
5 „ „ + 5 „ „	11·076
4 „ „ + 6 „ „	12·376

Die den verschiedenen Mischungen der betreffenden Standardlösungen entsprechenden Wasserstoffionenexponenten[1]) sind in den vorstehenden, von *Sörensen* ausgearbeiteten Tabellen dargelegt.[2])

Eine andere wichtige Anwendung von Lösungen von bekannter, stets leicht reproduzierbarer Wasserstoffionenkonzentration ist, einem System, z. B. einem Ferment-Substratgemisch, eine gewisse H·Konzentration zu erteilen, die während des ganzen Verlaufs der Ferment- (oder sonstigen) Reaktion festgehalten wird. Dazu eignen sich mit Vorteil die Ammonium-, Phosphat- und Acetatgemische, die natürlich auch als Vergleichslösungen bei der kolorimetrischen Methode ausgezeichnete Dienste leisten. Ausführliches hierüber ist im Band III, S. 1337 von *L. Michaelis* zu lesen und wir verweisen hier nur auf den betreffenden Abschnitt.

[1]) Vgl. diesen Band, S. 320.

[2]) Graphisch sind die Befunde in einer Kurventafel, an welcher die einer bestimmten Zusammensetzung der Lösungen entsprechenden Werte der Wasserstoffionenexponenten und die entsprechenden elektromotorischen Kräfte direkt abzulesen sind, dargestellt. Sie ist im Verlage von J. Springer, Berlin, erschienen.

Die Methoden der biologischen Mikrochemie.

Von **A. B. Macallum**, Toronto.

I. Einleitung.

Biologische Untersuchungen mittelst mikrochemischer Methoden sind mit besonderen Schwierigkeiten verbunden, die bei der Bestimmung der Zusammensetzung von anderen anorganischen und organischen Substanzen, Mischungen und Lösungen nicht auftreten. In dem letzten Falle ist auf mikrochemischem Wege z. B. einfach festzustellen, ob ein gewisses Element oder eine bestimmte Substanz in einem Tropfen von nicht weniger als 1 mm^3 vorhanden ist. Auf Zusatz der betreffenden Reagenzlösung kann durch Verdampfen konzentriert oder sogar zur Trockne gebracht werden, sei es auf dem Objektträger oder im Uhrglas. Die Reaktion wird auf diese Weise äußerst empfindlich gemacht. Ein solches Konzentrieren kann aber bei der mikrochemischen Untersuchung von Zellen oder Geweben nicht angewandt werden, denn die Verteilung der Salze oder überhaupt der Bestandteile der Gefäß- oder Zellflüssigkeit, bzw. der Flüssigkeit, welche mit dem kolloidalen Material des Zellzytoplasmas verbunden ist, würde dabei Veränderungen erleiden. Diffusion und Wiederverteilung sind bei einer gewöhnlichen mikrochemischen Untersuchung ohne Einfluß, aber bei irgend einer mikrochemischen Untersuchungsmethode auf biologischem Gebiete würden diese Erscheinungen die erhaltenen Resultate ziemlich wertlos gestalten. Es muß daher die Aufgabe der biologischen Mikrochemie sein, Diffusion und Wiederverteilung der betreffenden Elemente und Verbindungen bis zu einem Minimum so weit wie nur irgend möglich einzuschränken. Dies ist, wie eine kurze Betrachtung zeigen wird, in verschiedener Hinsicht keine leichte Aufgabe. Es gibt wenig Reaktionen, die, auch nur annähernd, sofort eintreten, und überhaupt keine, die augenblicklich vor sich gehen. Außerdem bilden von denjenigen, welche sich sofort abspielen, nur sehr wenige Niederschläge, und noch viel weniger sind überhaupt in der biologischen Mikrochemie brauchbar. Durch diesen Umstand allein sind schon zahlreiche Einschränkungen gegeben.

Es ist allerdings nicht bei jeder mikrochemischen Methode auf biologischem Gebiete unbedingt Schnelligkeit der Reaktion erforderlich. Ein

Beispiel bildet die Hämatoxylinreaktion auf Eisen. Die Verbindungen des letzteren sind in den Zellen gewöhnlich von unlöslicher Art und so wird bei alkoholgehärteten Präparaten solcher Zellen die Verteilung verhindert, welche während des Lebens statthat. Solche Verbindungen werden durch das Hämatoxylin nicht verändert; sie verändern aber mehr oder weniger langsam dieses Produkt, indem sie es in eine tief gefärbte unlösliche Substanz verwandeln, welche auch genau dort, wo sich jene Verbindungen befanden, auftreten. Eine solche Reaktion steht indessen einzig da und daher wird die allgemeine Forderung für die biologische Mikrochemie, daß die betreffende Reaktion wenigstens annähernd augenblicklich eintreten sollte, nicht beschränkt.

Eine andere Schwierigkeit liegt in der Undurchlässigkeit der Zellen und Gewebe, wodurch das schnelle Eindringen der Reagenzien, sei es im ganzen oder nur des einen oder anderen Bestandteiles derselben erschwert wird. Während des Lebens der Zellen schränkt diese mehr oder weniger große Undurchlässigkeit die Austauschmöglichkeit zwischen dem Inneren und der Außenwelt ein und die Reagenzien, die bei mikrochemischen Methoden gebraucht werden, sind von diesem Einfluß nicht völlig ausgenommen. Ehe ein Reagens imstande ist, in das Innere einer Zelle in genügender Weise einzudringen, um überhaupt die erforderliche Reagenzwirkung hervorzubringen, können Diffusionsströmungen vor sich gehen, die bewirken, daß die Reaktion, welche zuletzt stattfindet, nicht die ursprüngliche Verteilung der Bestandteile der Zelle veranschaulichen. Diesen störenden Einfluß gänzlich zu beheben ist unmöglich. Man kann nur darnach streben, ihn so einzuschränken, daß das Resultat nicht weiter beeinflußt wird. Zu diesem Zwecke muß man die Reagenzien in der Weise zu den isolierten Zellen bringen, daß alle Teile jeder einzelnen Zelle auf einmal erreicht werden. Bei den isolierten Zellen kann ein Reagens unter gewöhnlichen Umständen so rasch durchdringen, daß die Wiederverteilung seiner Salze bis auf ein Minimum eingeschränkt bleibt.

Es ist indessen hin und wieder nötig, die Verteilung eines Elementes oder einer Verbindung sowohl unmittelbar ohne Zelle, als auch in der Zelle zu kennen. Natürlich ist die Isolierung der individuellen Zellen eines Gewebes hier ohne Nutzen, denn diese ruft neue außerzellulare Bedingungen hervor und verändert so die Zusammensetzung an der Oberfläche der Zelle. Um dies so viel wie möglich zu vermeiden, müssen kleine Partikelchen frischen Gewebes von einem Durchmesser von nicht mehr als 20 μ angewandt werden. Zu diesem Zwecke wird das Kältemikrotom gebraucht, und die Teilchen werden, während noch flach und gefroren, sogleich mit dem Reagenz zusammengebracht. Das letztere gelangt auf diese Weise zu allen Teilen der Schnitte und auch fast ebenso schnell in das Innere der Zellen und selbst zum Kern.

Gegen diese Methode kann allerdings eingewandt werden, daß das Gefrieren die Verteilung der Salze in den Geweben verändert. Das Gefrieren beeinflußt nämlich etwas die Lokalisierung der Salze in den Zellelementen,

wenn das Wasser in dem Zytoplasma reichlich vorhanden ist. Die Bildung von Eiskristallen kann seine feine Struktur zerstören, und solche Veränderungen mögen beim Auftauen im Reagens nicht verschwinden. Ferner schließen die gebildeten Eiskristalle nicht die in dem Wasser gelösten Substanzen ein, von dem die Kristalle herrührten, und hierin liegt eine Möglichkeit, daß, wenn der betreffende Schnitt im Reagens taut, diese gelösten Stoffe wo anders als in ihrer ursprünglichen Lage beobachtet werden können. Diese Schwierigkeiten sind indessen derart, daß sie die Resultate mikrochemischer Untersuchungen frischer Zellen kaum oder nicht beeinflussen. Schon nach wenig Übung ist man fähig, zwischen einer so veränderten Verteilung und dem normalen Zustande zu unterscheiden. Weitaus bei der größten Mehrzahl der Fälle liegen Zellen vor, deren Wassergehalt im Verhältnis zu dem vorhandenen Kolloid nur gering ist, so daß bei dem Gefrierprozeß die Bildung von Eiskristallen meßbarer Dimension nicht stattfindet.

Jedenfalls steht aber fest, daß man bei mikrochemischen Forschungen auf biologischem Gebiete die größte Aufmerksamkeit verwenden muß, sowohl in bezug auf die Auswahl der Methoden als auch in betreff der aus den erhaltenen Resultaten zu ziehenden Schlüsse. Auf Empirismus und nur auf allgemeine Erfahrungen gegründete Schlüsse müssen vermieden werden und Folgerungen dürfen a priori nur nach außerordentlich sorgfältiger Prüfung all der betreffenden in Betracht kommenden Bedingungen gezogen werden. Außerdem muß der Forscher der biologischen Mikrochemie umfassende Kenntnisse auf dem Gebiete der anorganischen, organischen und physikalischen Chemie besitzen. Wäre dies immer der Fall gewesen, so würden manche Fehler, die man in der Literatur findet, vermieden worden sein. Und endlich ist für solche Untersuchungen viel Geduld erforderlich.

II. Die Methoden.

Die Methoden der biologischen Mikrochemie sind bisher nur so weit ausgearbeitet worden, um organisch und anorganisch gebundenes Eisen, Kalium, Calcium in organischen Verbindungen, Kupfer, Chlor, Jod, Phosphorsäure, organischen Phosphor in Kernverbindungen und Schwefelsäure als Sulfat örtlich bestimmen zu können.

Im Folgenden sollen die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der genannten Elemente in der Reihenfolge, wie letztere eben angeführt wurden, besprochen werden.

A. Eisen, anorganisch und organisch.

Um das Eisen in Geweben zu lokalisieren, müssen die letzteren gehärtet werden, und zwar so, daß die Anordnung der Eisenverbindungen nicht beeinflußt wird.

Für diesen Zweck ist Alkohol das beste Fixierungsmittel. Er ändert die Zusammensetzung der organischen und anorganischen Eisenverbindungen

in keiner Weise. Eine solche Beeinflussung wird dagegen durch Behandeln der Gewebe nach der *Hall*schen Methode [1]) hervorgerufen, nach welcher zwei verschieden konzentrierte Lösungen von Ammoniumsulfid in Alkohol zum Härten eisenhaltiger Gewebe verwendet werden. *Hall* benutzte das Sulfid, da er glaubte, daß Alkohol allein Eisenverbindungen aus Geweben zu extrahieren vermag, und daß daher die mit Alkohol fixierten Gewebe fehlerhafte Präparate in bezug auf ihren Eisengehalt darstellen. Diese Annahme trifft jedoch nicht zu. Es ist wohl richtig, daß, wenn man ein Eisensalz als härtendes Agens anwendet, gerade so wie man auch Kaliumbichromat oder Chromsäure benutzt, durch nachfolgende Behandlung des gehärteten Gewebes mit Alkohol ein großer Teil des derart angewandten Eisensalzes extrahiert wird. Die Eisenverbindungen aber, die in den lebenden Geweben vorkommen, werden, vielleicht nur mit Ausnahme des Hämatins, auf diese Weise nicht extrahiert, denn sie bestehen aus Phosphat, Karbonat, Oxyd und vermutlich, wenigstens spurenweise, aus Sulfat — alle Verbindungen, die in der Ferriform vorliegen und die selbst in verdünntem Alkohol von 50⁰/₀ unlöslich sind. Außerdem wird das Eisensalz, das durch die Darmepithelzellen eines Tieres absorbiert wird, das mit beträchtlichen Mengen eines löslichen Eisensalzes gefüttert wurde, mit 90⁰/₀igem Alkohol nicht extrahiert, wie durch Kontrollpräparate bewiesen worden ist. Dies beruht auf der Tatsache, daß der Charakter der absorbierten Verbindungen durch das Zytoplasma der lebenden Zellen verändert wird, und daß sie dadurch unlöslich oder vielmehr viel weniger löslich in Wasser und vollständig unlöslich in konzentriertem Alkohol werden. Die Verbindungen, die nicht in erwähnter Weise zur Absorption gekommen sind, können in die Epithelzellen diffundieren. Die Oberfläche der Schleimhaut muß daher vor der Behandlung mit Alkohol schnell mit Wasser abgespült oder zwischen Fließpapier abgepreßt werden, um anhaftende Flüssigkeit mit ihrem Eisengehalt zu entfernen.

Das Eisen des Hämatins wird bei fortgesetzter Behandlung mit Ammonsulfid in Ferrosulfid übergeführt. Außerdem zersetzt das Ammoniumsulfid selbst in Alkohol Hämoglobin und macht in geringen Mengen Hämatin frei, das, bevor es zersetzt wird, diffundiert. Hier liegt also eine Fehlerquelle vor. Der Hauptfehler beim Ammoniumsulfidverfahren liegt jedoch darin, daß Ammoniumsulfid organische Eisenverbindungen angreift und Eisen in Freiheit setzt. Das letztere findet sich dann mitunter in dem Eisen der anorganischen Verbindungen.

Von *Swirski* [2]) und *Tartakowsky* [3]) wurde für die Untersuchung auf Eisen zum Härten von Gewebspräparaten eine 4⁰/₀ige Formollösung als

---

[1]) *Winf. S. Hall,* Über das Verhalten des Eisens im tierischen Organismus. Arch. f. Anat. und Physiol., Physiol. Abt. 1896. S. 49.

[2]) *G. Swirski,* Über die Resorption und Ausscheidung des Eisens im Darmkanale des Meerschweinchens. Arch. für die ges. Physiol. **74**. S. 466 (1899).

[3]) *S. Tartakowsky,* Die Resorptionswege des Eisens beim Kaninchen. (Eine mikrochemische Studie.) Arch. für die ges. Physiol. **100**. S. 586 (1903).

zuverlässig empfohlen. Indessen behauptet *Falkenberg*[1], daß Formollösung wegen Säuregehaltes die Eisensalze in den Geweben zersetzt und folglich eine Veränderung in der Verteilung des frei gemachten Eisens bedingt. *Nishimura*[2]) dagegen, welcher 10%ige Formollösung für eisensalzreiche Leberpräparate benutzte, fand, daß selbst nach 24 Stunden die abfiltrierte, härtende Flüssigkeit keine merkliche Eisenreaktion zeigte. Er empfahl deshalb noch aus verschiedenen anderen Gründen den Gebrauch von Formollösung zur Härtung des erwähnten Materials.

Sowohl *Nishimura* als auch *Falkenberg* halten den Alkohol als ein geeignetes Härtungsmittel für eisenhaltige Gewebe. Ersterer gibt allerdings an, daß es in gewissem Grade Schrumpfung hervorruft, eine Wirkung, die durch Formol nicht erhalten wird. Was aber die Verteilung des Eisens in den fraglichen Präparaten betrifft, so sollen die beiden Härtungsmethoden keine Unterschiede aufweisen. Nach *Abderhalden*[3]) trifft dies jedoch nicht zu. Er fand, daß durch die Härtung mit Alkohol die Eisenreaktion in den Geweben so beeinflußt wird, daß es unmöglich ist, sich ein genaues Bild über die Verteilung des Eisens zu machen.

Nach unseren eigenen Beobachtungen ist für eisenhaltige Organe Alkohol das Härtungsagens, welches am einwandfreiesten erscheint. Formol in 4—10%iger Lösung steht in dieser Hinsicht dem Alkohol nach, denn, wenn Eisensalze in Alkohol löslich sind, sind sie es ebenso und vielfach noch reichlicher in Formollösung. Aus theoretischen Gründen erscheint der Gebrauch von Alkohol oder Formol nicht geeignet bei der Härtung der Darmschleimhaut von Tieren, die mit leicht löslichen Eisensalzen gefüttert wurden, denn in solchen Fällen würden vermutlich die in Alkohol oder Formol löslichen Eisensalze durch das eine oder das andere Mittel extrahiert werden. Wie schon erwähnt, werden die Eisensalze, die vom Zytoplasma der Epithelzellen der Darmzotten absorbiert werden, von dem Eiweiß des Zytoplasmas zurückgehalten, so daß Alkohol allein, direkt angewandt, sie nicht extrahiert. Wenn solche Zellen in frischem Zustande bei Anwendung schwachen Ammoniumsulfides aufgehen, so wird die Verteilung des in dem Zytoplasma vorhandenen Eisens in keiner Weise verschieden sein von der, die bei einem alkoholgehärteten Material eines gleichen Präparates gefunden wird.

Jedenfalls ist es vorteilhafter, sich für die Härtung anderer Agenzien zu bedienen, und zwar sind am geeignetsten Formol und Ätzsublimat. Das erstere wird in einer Konzentration von 4—6% angewandt. Indem man es auf kleine Stücke des Gewebes 2 Tage lang einwirken läßt, erhält man brauchbare Präparate. Nachdem die Gewebe in Wasser getaucht worden sind, um den Überschuß des Formalins zu entfernen, können sie mit dem Kältemikrotom geschnitten werden. Die nachfolgende Behandlung

[1]) *Falkenberg*, Zentralbl. für allgem. Path. **15**. S. 662 (1904).

[2]) *Nishimura*, Zentralbl. für allgem. Path. **21**. S. 10 (1910).

[3]) *E. Abderhalden*, Die Resorption des Eisens, sein Verhalten im Organismus und seine Ausscheidung. Zeitschrift für Biologie. **39**. S. 113 (1900).

zur Untersuchung auf den Eisengehalt ist dieselbe, wie sie bei dem mit Alkohol behandelten Material angewendet wird. Sie ist weiter unten beschrieben.

Ätzsublimat in gesättigter Lösung kann zu gewöhnlichen Härtungszwecken bei histologischen Untersuchungen und bei Schnitten angewandt werden, die entweder mittelst der Paraffinmethode oder mit dem Gefriermikrotom hergestellt werden. Die auf diese Weise gehärteten Gewebe sind nicht für die Behandlung mit Ammoniumsulfid geeignet. Das vorhandene Mercurisalz gibt mit dem Sulfid das dunkle Mercurisulfid, welches das entwickelte Ferrosulfid verdecken kann. Ferner reagieren die Eisensalze in solchen Präparaten nicht gut mit reinen, wässerigen Hämatoxylinlösungen.

Die einzige, zuverlässige Methode zur Demonstrierung des Eisens ist diejenige mit der Säure-Ferrocyanidmischung, welche so, wie es bei den Alkoholpräparaten beschrieben, gebraucht werden kann.

Ferner ist auch das *Hall*sche Agens brauchbar. Es wird, wie schon erwähnt, in zwei Konzentrationen angewandt. Die eine Lösung enthält 30 Vol.-Teile Ammoniumsulfid und 70 Vol.-Teile Alkohol und die andere 5 Vol.-Teile Sulfid, 25 Teile Wasser und 70 Vol.-Teile Alkohol. Die erste wird für die Behandlung der Darmschleimhaut, die letztere für die Leber, die Milz und die Niere benutzt. Man läßt sie 2—3 Tage auf kleine Stückchen der Organe einwirken, dann wird mit reinem Alkohol gewaschen, und derselbe so oft erneuert, bis das freie Sulfid völlig entfernt worden ist. Hierauf wird das Gewebe in Paraffin eingebettet und dann zerteilt, oder es wird mit dem Gefriermikrotom in kleine Teilchen geschnitten. Solche Stückchen kann man mit Ammoniumsulfid übergießen (1 Teil Sulfid, 2 Teile Wasser) und dann in Glyzerin einlegen oder auch $^1/_2$ Stunde lang mit Säure-Ferrocyanidlösung behandeln, darauf mit Wasser abspülen, mit Alkohol entwässern, mit Xylol klären und in Balsam einbetten.

Die anderen Reagenzien, die zuweilen für diese Zwecke gebraucht werden, z. B. Pikrinsäure, *Müller*sches Reagens, Chromsäure, bieten keine besonderen Vorteile; entweder beeinträchtigen sie die Zusammensetzung und die Verteilung der Eisenverbindungen oder die Deutlichkeit der Eisenreaktion, sei es die Berlinerblauprobe oder die Ferrosulfidreaktion. Sie sind weniger einwandfrei als Ammoniumsulfid, da sie nicht nur organische Eisenverbindungen zersetzen, sondern auch zur Verteilung des in Freiheit gesetzten Eisens beitragen.

Von den verschiedenen Gesichtspunkten aus betrachtet, ist Alkohol jedenfalls das geeignetste Reagens zum Härten von eisenhaltigen Geweben. Es ist zum Nachweis der Verteilung der Eisensalze, sowohl in tierischen als in pflanzlichen und auch in pathologischen Geweben, gut geeignet.

Anwendung: Die Gewebe oder Organe werden in kleine Stücke geschnitten, die nicht mehr als 5 *mm* im Durchmesser haben, und sofort, nachdem sie dem Tiere oder der Pflanze entnommen sind, in absoluten Alkohol gelegt. Nach Verlauf von 24 Stunden wird der Alkohol durch

frischen ersetzt und dies wird am Ende des zweiten Tages wiederholt. Die Behandlung mit Alkohol soll auf keinen Fall weniger als 48 Stunden dauern. Ein längeres Verweilen in Alkohol beeinträchtigt nicht den Wert der Präparate. Die zur Behandlung erforderlichen Gefäße müssen durchaus sauber sein und die zu verwendenden Schneidinstrumente frei von Rost oder von irgend einer Eisenverbindung.

Liegen Protozoen oder Protophyten zur Untersuchung vor, so muß man zu der betreffenden Flüssigkeit soviel Alkohol zufügen, daß eine Konzentration von 90% resultiert. Nach 24 Stunden können die Organismen durch 3 oder 4 Minuten langes Zentrifugieren mittelst einer gewöhnlichen klinischen Zentrifuge abgetrennt werden; dann wird mit Alkohol dekantiert und frischer Alkohol zugefügt. Wenn das Untersuchungsmaterial genügend gehärtet ist, wird es mit den geeigneten Reagenzien zur Demonstration des organischen und anorganischen Eisens behandelt.

Handelt es sich um Gewebe, so müssen sie, nachdem sie genügend gehärtet sind, so zerteilt werden, wie es für histologische Studien gebräuchlich ist. Sind es pflanzliche Präparate (Blatt, Stengel), so muß die Zerteilung mit freier Hand vorgenommen werden, und zwar mit einem Messer, das mit Alkohol befeuchtet ist. Solche Präparate müssen in Alkohol aufbewahrt werden, bis man sie zur Demonstration des vorhandenen Eisens benutzt. Zur Gewinnung von Schnitten tierischer Gewebe und Organe dienen die beiden folgenden Methoden:

1. Die Paraffinmethode und 2. die Behandlung mit dem Kältemikrotom.

1. Bei dem ersten Verfahren wird das Material aus absolutem Alkohol in Chloroform übergeführt und darin für einen Tag belassen, dann legt man es in eine gesättigte Lösung von Paraffin und Chloroform und läßt es darin bei 35° wieder einen Tag, und endlich wird es ebensolange in schmelzendem Paraffin bei 55° C belassen. (Das verwendete Paraffin darf nicht höher als bei 53° C schmelzen.) Das Schneiden der Präparate zu einer Stärke von 5—15 μ wird in der gewöhnlichen Weise vorgenommen. Das anhaftende Paraffin wird durch Xylol und das letztere durch absoluten Alkohol entfernt. Die Schnitte werden bis zur Untersuchung in Alkohol aufbewahrt.

2. Werden die Präparate mittelst des Gefrierprozesses dargestellt, so wird das Material eine halbe Stunde lang in völlig reines destilliertes Wasser gelegt und dann werden mit einem Mikrotom Schnitte hergestellt; hierzu bedient man sich als Gefriermittel vorteilhaft flüssiger Kohlensäure. Die Dicke der Schnitte sollte nicht mehr als 20 μ betragen, möglichst aber noch weniger. Die so dargestellten Präparate werden bis zur nachherigen Behandlung in absolutem Alkohol aufbewahrt.

a) Der Nachweis von anorganischen Eisenverbindungen.

Um das Vorhandensein und die Verteilung von anorganischem Eisen in den nach einer der obigen Methoden dargestellten Präparaten nachzu-

weisen, müssen die Schnitte 24 Stunden lang in eine frisch bereitete, 0·5%ige wässerige Lösung reinen Hämatoxylins [1]) aufbewahrt werden. Die braungelbe Farbe, die sie darnach aufweisen, kann teilweise durch Auswaschen mit destilliertem Wasser beseitigt werden, oder am sichersten, indem die Präparate in absoluten Alkohol gebracht und dann mit dem gleichen Volumen Äther versetzt werden. Waren die Schnitte lange genug in der Flüssigkeit — 1—2 Stunden lang —, so ist das von dem Gewebe unangegriffen gebliebene Hämatoxylin vollständig extrahiert. Die blauschwarze Mischung dagegen widersteht der Extraktion energisch. Es ist jedoch nicht nötig, die Extraktion weiter fortzusetzen, denn eine leicht braungelbe Nuance des Schnittes führt zu keiner Verwechslung, da sie in sehr bemerkbarem Kontrast mit der Färbung steht, welche durch die Einwirkung des Hämatoxylins auf anorganischem Eisen — wo es auch im Präparate vorhanden sein mag — hervorgerufen wird. Auf diese Weise behandelte Präparate können mit Eosin oder Safranin gefärbt werden. Nachdem sie so oder so behandelt worden sind, werden sie durch absoluten Alkohol dehydriert, mit Xylol behandelt und in Benzol eingebettet.

Überall, wo anorganisches Eisen in den Schnitten vorkommt, sei es als Oxyd, als Phosphat, als „Albuminat" oder in Form irgend einer anderen unbekannten Verbindung, gibt es den blauen oder blauschwarzen Flecken des Eisenhämatoxylins nach *Heidenhain*. Die Färbung tritt genau an dem Orte auf, an welchem die anorganischen Eisenverbindungen in den Schnitten vorhanden sind; sie ist eine außerordentlich genaue mikrochemische Reaktion für anorganisches Eisen.

Eine weniger wirkungsvolle, aber doch noch recht genaue Probe auf Eisen in den Präparaten ist die, welche auf der Bildung von Berlinerblau beruht. Zur Ausführung dieser Reaktion werden die Schnitte unmittelbar nach Entfernung aus dem Alkohol 30 Minuten lang in einer Mischung gleicher Volumina 0·5%iger Salzsäurelösung und 1·5%iger Ferrocyankaliumlösung belassen. Dann werden sie mit destilliertem Wasser gewaschen, um jede Spur Säure zu entfernen, hierauf mit absolutem Alkohol entwässert, mit Xylol behandelt und nun in Balsam eingebettet. Überall, wo anorganisches Eisen in den Schnitten vorkommt, tritt eine deutliche

[1]) Dieses Reagens, das vom Verfasser vor 14 Jahren für den mikrochemischen Nachweis von anorganischem Eisen in Geweben eingeführt wurde, ist außerordentlich empfindlich, fast, oder vielmehr ganz so scharf, wie es sonst bei der Reagenzglasprobe Ammoniumsulfid und Säure-Ferrocyanidmischung für Eisen in Lösung sind. Es ist aber wertlos bei Gegenwart von freier Säure, wie bei dialysiertem Eisen (Liquor ferri dialysati), oder bei Überschuß von löslichen Eisensalzen, wie z. B. Eisenalaun. Dagegen ist es außerordentlich wertvoll, wenn es sich um den Nachweis von äußerst kleinen Mengen von Eisensalz in den Geweben handelt. Außerdem hat es den besonderen Vorteil, daß es gegen anorganische Eisenverbindungen vollständig indifferent ist. Nähere Mitteilungen über die Eigenschaften dieses Eisenreagenzes vergleiche bei *A. B. Macallum*, A new method of distinguishing between organic and inorganic compounds of iron. Journal of Physiol. 22. p. 92 (1907).

Berlinerblau-Reaktion auf, während hingegen an den eisenfreien Stellen der Schnitte nicht die geringste Farbreaktion zu bemerken ist.

Wenn das Material mit irgend einer *Hall*schen Flüssigkeit gehärtet wurde, ist das vorhandene, anorganische Eisen als Ferrosulfid fixiert. In Schnitten derartiger Präparate verblaßt die anfänglich dunkelgrüne Färbung dieser Verbindung bald mehr oder weniger. Man muß sie deshalb mit verdünnter Ammoniumsulfidlösung behandeln, wodurch die Reaktion deutlich erkennbar gemacht wird (1 Teil Ammoniumsulfidlösung und 2 Teile Wasser). Dann wird mit destilliertem Wasser gewaschen und 30 Minuten lang in einer Mischung gleicher Volumina 0·5%igen Salzsäurelösung und einer 1·5%igen Ferrocyankaliumlösung aufbewahrt. Hierauf wird gut mit Wasser gewaschen, mit Xylol geklärt und dann in Kanadabalsam eingebettet. Das vorhandene Eisen wird als blaue Verbindung, die in jeder Hinsicht dem Berlinerblau gleicht, nachgewiesen.

Gerade wie in den Hämatoxylinpräparaten kann man auch bei den Berlinerblauproben eine Kontrastfärbung hervorrufen. Zu diesem Zwecke werden die Schnitte unmittelbar, nachdem sie zur Entfernung der Säure-Ferrocyanidmischung gewaschen worden sind, 30 Minuten lang in eine Lösung von Safranin (1% in 30% Alkohol) gelegt. Hierauf wird einige Male mit Alkohol gewaschen, vollständig mit absolutem Alkohol entwässert, dann mit Xylol geklärt und in Balsam eingebettet. Die rote Färbung des Safranins steht im augenfälligen Gegensatz zu der Berlinerblau-Eisenreaktion. Die Berlinerblaufärbung solcher Eisenpräparate neigt zum Verblassen. Man kann diesen Vorgang bedeutend einschränken, indem man die Schnitte im Dunkeln aufbewahrt. Helles Sonnenlicht vermag die Berlinerblauprobe in wenigen Wochen gänzlich zu bleichen.

Vorübergehend haltbare Präparate können gewonnen werden, indem man die frisch aus dem Alkohol entnommenen Schnitte behandelt und sie auf den Objektträger in einer Mischung gleicher Teile Ammoniumsulfids und Glyzerins einlegt. Das Eisen wird so als ein dunkelgrüner durch die Struktur des Schnittes hindurchschimmernder Fleck nachgewiesen.

Sowohl bei dieser Methode, als auch bei der, bei welcher das Eisen mit der Berlinerblaureaktion nachgewiesen wird, läuft man Gefahr, die leichter angreifbaren organischen Eisenverbindungen, welche spurenweise in den Schnitten vorhanden sind, mit einzuschließen. Ammoniumsulfid macht das Eisen aus einer so beständigen organischen Verbindung wie Vitellin des Eidotters schneller frei als Ferrosulfid, und man muß daher darauf bedacht sein, daß in solchen Präparaten, besonders in denjenigen der Duodenalschleimhaut von Tieren (Meerschweinchen und Kaninchen), die mit Eisensalzen gefüttert wurden, bei Anwendung dieses Reagenzes mehr Eisen nachgewiesen wird, als wenn man die direkt aus dem Alkohol entnommenen Schnitte nur mit reiner, wässeriger Hämatoxylinlösung behandelt. Bei solchen organischen Verbindungen setzt auch die Salzsäure des Säure-Ferrocyanidreagenzes das Eisen in Freiheit und infolgedessen kann mittelst der Berlinerblaureaktion ebenfalls mehr Eisen angezeigt

werden, als dem Eisen der vorhandenen anorganischen Eisenverbindungen entspricht.

Wenn daher Ammoniumsulfid oder das Säure-Ferrocyanidreagens zum Nachweis von anorganischen Eisenverbindungen in einem Gewebe gebraucht werden, müssen die erhaltenen Resultate immer durch Präparate desselben Gewebes oder Organes, die mit wässeriger Hämatoxylinlösung in der bereits beschriebenen Weise behandelt worden sind, kontrolliert werden.

b) Der Nachweis von organischen oder „maskierten" Eisenverbindungen.

Der Nachweis des organischen oder „maskierten" Eisens ist im ganzen ein viel schwierigerer Prozeß als der zur Bestimmung von anorganischen Eisenverbindungen. Er besteht in der vorsichtigen Infreiheitsetzung von festgebundenem Eisen aus seinen Verbindungen durch verlängerte Einwirkung von frisch präpariertem saurem Ammoniumsulfid, $NH_4 HS$, in Glyzerin auf die isolierten, bei einer Temperatur von umgefähr 60° C gehärteten Zellen. Da dieses Reagens außerordentlich wirksam auf Eisen ist [1], müssen die bei dieser Methode verwendeten Gefäße, Objektträger, Deckgläser und Flüssigkeiten unbedingt frei von Eisen sein. Dies ist eine schwer zu erfüllende Anforderung! In Anbetracht der Wichtigkeit, welche die zu lösenden Probleme auf dem Gebiete der Zytochemie haben, muß ihr aber unbedingt in jeder Beziehung nachgekommen werden. Man braucht eine Lösung von saurem Ammoniumsulfid und von Glycerin in Wasser in einer Konzentration von 50%. Das Sulfid wird dargestellt durch Einleiten von Schwefelwasserstoff, der zuvor eine Waschflasche passiert hat, in eine Ammoniaklösung von der Dichte 0·96. Die Flasche, die das Ammoniak enthält, muß von jeder Spur Eisen befreit worden sein, und

[1] Im Reagenzglas kann man mit Ammoniumsulfid noch 1 Teil Eisen in 1000000 Teilen Wasser nachweisen. Diese Reaktion ist noch ganz deutlich, wenn man sie mit Kontrollproben vergleicht, die mittelst Wassers und Ammoniumsulfids angestellt sind. Das Säure-Ferrocyanidreagens ist von gleicher Empfindlichkeit. Durch das Mikroskop wird der Nachweis der Empfindlichkeitsgrenze beider Reagenzien beträchtlich verstärkt. Es ist sehr gut möglich, daß ein Schnitt, nach der einen oder andern Methode behandelt, dem bloßen Auge kein Eisen erkennen läßt, während er, unter dem Mikroskop bei gutem Licht betrachtet, unendlich kleine Mengen Eisen anzeigt. *Schorl* (Zeitschr. für analyt. Chemie. **46**. S. 659) fand, daß mittelst dieser Reaktion, nach der gewöhnlichen analytischen mikrochemischen Methode untersucht, bei Verwendung eines Mikroskops, dessen lineare Vergrößerung 70 beträgt, noch die Gegenwart von 0·000002 *mg* Eisen nachgewiesen werden kann, während bei der Reagenzglasprobe mit dem bloßen Auge nur 0·01 *mg* durch dieselbe Reaktion feststellbar sind. Bei biologisch-mikrochemischen Untersuchungen steht die Empfindlichkeit allerdings nicht in Proportion zur mikroskopischen Vergrößerung, aber man kann doch als sicher annehmen, daß die Empfindlichkeit zehnmal vermehrt ist. Andererseits ist Ammoniumsulfocyanid viel weniger empfindlich bei der Reagenzglasprobe als Ammoniumsulfid oder das Säure-Ferrocyanidgemisch, und für biologisch-mikrochemische Untersuchungen ist es überhaupt unbrauchbar.

zwar durch Auswaschen mit einer heißen Lösung von Schwefelsäure und Salzsäure. Das Einleiten des Gases in die Ammoniaklösung wird so lange fortgesetzt, bis der Ammoniakgeruch verschwunden und der Geruch des Schwefelwasserstoffes deutlich geworden ist. Das Reagens ist jetzt gebrauchsfertig. Zur Aufbewahrung wird die Flasche mit einem Glasstopfen gut verschlossen.

Das Glyzerin soll absolut rein sein oder wenigstens frei von allen anorganischen Verbindungen. 10 *cm*³ davon sollten beim Verdampfen in einem Platintiegel über einer Bunsenflamme keinen Rückstand hinterlassen. Für den Gebrauch wird es mit dem gleichen Volumen reinen, destillierten Wassers verdünnt.

Die Objektträger und Deckgläschen müssen mit Alkohol gereinigt werden. Dann werden sie einige Minuten lang in heiße Salzsäure — durch Verdünnen der konzentrierten Säure mit 2 Volumen Wasser hergestellt — gelegt. Hierauf wäscht man mit destilliertem Wasser und trocknet, worauf sie gebrauchsfertig sind.

Durch dieses Verfahren wird, wie meine Erfahrungen beweisen, sicher jede Spur Eisen von den Gläsern entfernt. Sollte man sich selbst davon überzeugen wollen, so kann man sich Kontrollpräparate bedienen, die unter Benutzung von Siliciumobjektträgern und Deckgläschen hergestellt sind. Diese Siliciumgläser sind sehr teuer; man wird infolgedessen nur wenige davon gebrauchen. Man wird überhaupt bald zu der Überzeugung kommen, daß sie zu entbehren sind, und daß an ihrer Stelle einwandfrei die, wie oben beschrieben, gereinigten gewöhnlichen Glasobjektträger zu benutzen sind.

Die Methode zur Darstellung der Präparate ist eine einfache. Ein Schnitt von dem in Alkohol aufbewahrten Präparate wird auf dem Objektträger mittelst einer Gänsekielspitze in einen Tropfen verdünnten Glycerins übertragen, um den Gebrauch metallischer Nadeln zu vermeiden. Man bedient sich nun eines kleinen Seziermikroskops. Das Zerzupfen muß so vorgenommen werden, daß viele Zellen des Präparates isoliert werden. Nachdem dies erreicht ist, wird ein Tropfen der sauren Ammoniumsulfidlösung zugefügt und, nachdem das Glyzerin und das Sulfidreagens mittelst Rührens mit dem Gänsekiel durchgemischt sind, wird mit einem Deckgläschen, das groß genug ist, um das gesamte Präparat einzuschließen, bedeckt. Die passendste Größe für die Deckgläser beträgt 20—22 *mm* im Quadrat. Es muß eben auf dem Objektträger liegen, das heißt, es muß nicht auf der einen Seite höher als auf der andern sein, denn dann würden Reagens und Glyzerin während des nachfolgenden Konzentrierens von der geneigten Seite zurückgehen. Unter solchen Umständen würde ein unbrauchbares Präparat entstehen. Sollte irgend ein Teil des Präparates eine schiefe Lage des Deckgläschens verursachen können, so entfernt man es, ehe man zudeckt.

Jetzt wird das Präparat sorgfältig unter dem Mikroskop beobachtet, um festzustellen, wie weit schon eine Eisenreaktion stattgefunden hat.

Eine solche Reaktion kann normalerweise in den Schnitten gewisser Organe, wie z. B. der Milz und der Leber und Niere in pathologischen Zuständen auftreten. In andern und gesunden Organen, z. B. Pankreas, Magenschleimhaut, Speicheldrüsen, Hoden und Ovarien, wird dabei gewöhnlich keine Reaktion beobachtet. Solche Präparate geben nach dieser Methode wertlose Resultate.

Die Präparate werden nun, mögen sie frei von unmittelbar demonstrierbarem Eisen sein oder nicht, in einen Trockenkasten bei 60° für einige Tage bis zwei Wochen belassen. Bei richtiger Behandlung beginnen die Kerne der isolierten Zellen spätestens am Ende des zweiten Tages eine schwache Grünfärbung aufzuweisen. Die Färbung nimmt von Tag zu Tag an Intensität zu, bis sie dunkelgrün geworden ist. Eine intensivere Färbung erscheint in der Regel nicht. Man bemerkt jetzt deutlich, daß die Kernreaktion durch das Chromatin des Kerns begrenzt ist. In gewissen Fällen, z. B. bei pankreatischen Zellen und den Hauptzellen der Magendrüsen, kann im Protoplasma, das sich in der Nähe des Kerns befindet oder ihn direkt begrenzt, eine Reaktion erhalten werden. In den Nervenzellen zeigen die *Nißl*schen Granulationen die Gegenwart von Eisen an.

Um zu beweisen, daß die dunkelgrüne Färbung in diesen Präparaten tatsächlich auf der Bildung von Ferrosulfid beruht, nehme man folgende Operation vor: Man läßt unter das Deckgläschen etwas Wasser eindringen, um das Glyzerin und das Sulfid wegzuwaschen. Darnach läßt man einen Tropfen einer Mischung von gleichen Teilen 0·5%iger Salzsäurelösung und 1·5%iger Kaliumferricyanidlösung unter das Deckglas fließen. Dieser Versuch läßt sich nicht immer erfolgreich durchführen, denn die Waschflüssigkeit kann die isolierten Zellen entfernen. Ist dies jedoch vermieden worden, so tritt die tiefblaue Färbung ein, welche in seiner Deutlichkeit unverkennbar ist.

Um Präparate mit isolierten Zellen zu erhalten, kann man an Stelle der beschriebenen Schnitte kleine Stücke des zu untersuchenden Materials benutzen, indem man sie auf dem Objektträger in der Glyzerinsulfidmischung auszieht. Wenn das Auszupfen sorgfältig vorgenommen wird, können die Präparate ebensogut sein, wie die oben erwähnten Schnitte. Die letzteren bieten aber den Vorzug, die Art der Verteilung des vorhandenen anorganischen Eisens gut beobachten zu lassen. Ferner werden Verwechslungen zwischen diesem Eisen und demjenigen, das erst durch verlängerte Einwirkung des Sulfids auf die isolierten Zellen auftritt, vermieden.

Bei der Untersuchung der Verteilung des organischen Eisens in Protozoen und Protophyten brauchen diese nur in Alkohol gehärtet zu werden. Die Härtung wird gewöhnlich durch mindestens 48stündiges Belassen in Alkohol erreicht. Wenn der Vorrat dieser Organismen ein genügender ist, so wird die Flüssigkeit, in welcher sie sich befinden, mit 95%igem Alkohol, und zwar mit der neunfachen Menge ihres Volumens gemischt. Nach Verlauf von 24 Stunden wird die klare Flüssigkeit ab-

gegossen, und es wird wieder absoluter Alkohol zugesetzt. Nach nochmals 24 Stunden wird der überstehende Alkohol abgegossen und durch frischen absoluten Alkohol ersetzt. Diesen läßt man nun zwei Tage lang einwirken. Die gehärteten Organismen werden jetzt mit einer Pipette, und zwar mit einer möglichst geringen Menge Alkohol aufgenommen und tropfenweise auf den Objektträger gebracht. Nachdem der Alkohol zum größten Teil verdunstet ist, fügt man das Sulfidreagens und das Glyzerin hinzu, bedeckt mit einem Deckgläschen und bringt nun das Präparat in einen auf 60° erwärmten Trockenkasten, damit die Reaktion mit dem organischen Eisen eintreten kann. Hierzu sind Tage erforderlich. Um das Maximum der Reaktion zu erreichen, können selbst zwei Wochen vergehen.

Bei größeren Organismen kann die Entwicklung der Reaktion auf organisches Eisen viel längere Zeit in Anspruch nehmen, als es bei kleineren Organismen der Fall ist. Dies beruht auf dem geringeren Eindringungsvermögen des Reagens. Bei homogenen Membranen wird die Diffusion in den gehärteten Organismus verhindert und die Reaktion tritt überhaupt nicht ein. Dies letztere ist der Fall bei Vaucheriapräparaten und häufig bei Cladophora- und Spirogyrapräparaten. Wenn jedoch die Kerne und andere eisenhaltige Teile des Zytoplasmas in diesen Präparaten aus der einschließenden Membran, durch Bruch derselben, in Freiheit gesetzt werden, wird die Reaktion ohne Schwierigkeit oder ohne besonderen Aufschub erhalten.

Zuweilen ist es vorteilhaft, das organische Eisen in Schnitten (von 5—10 μ Dicke) des alkoholgehärteten Gewebes im ganzen nachzuweisen. Zu diesem Zwecke werden die Schnitte 1—4 Tage lang in schwefelsäurehaltigem Alkohol, der aus 4 Vol. reiner konzentrierter Schwefelsäure (spez. Gew. 1·84) und 100 Vol. absolutem Alkohol besteht, gelegt. Die mit Glasstopfen verschließbare Flasche, in der Flüssigkeit und Schnitte aufbewahrt werden, muß natürlich vorher zur Entfernung jeder Spur von Eisen sorgfältig gereinigt werden. Die Temperatur während des Härtungsprozesses soll andauernd 35—40° C betragen. Die Säure setzt das Eisen langsam aus den vorhandenen, organischen Verbindungen in Freiheit. Der Säurealkohol extrahiert das Eisen aus den Schnitten allerdings langsamer, als es in Freiheit gesetzt wird. Am Ende des zweiten Tages hat die Reaktion gewöhnlich ihr Maximum erreicht, und die Schnitte können jetzt nach der einen oder der anderen Weise zum Nachweis des in Freiheit gesetzten Eisens behandelt werden. Nach dem einen Verfahren werden die Schnitte mit absolutem Alkohol gewaschen, um jede Spur Säure zu entfernen, dann 24 Stunden lang in einer 0·5%igen Hämatoxylinlösung belassen, hierauf mit Alkohol entwässert, mit Xylol geklärt und in Balsam eingebettet. Nach dem anderen Prozeß bringt man die Schnitte sofort für eine halbe Stunde lang in eine frisch bereitete Mischung gleicher Volumina 0·5%iger Salzsäure und 1·5%iger Ferrocyankaliumlösung, wäscht sie darauf sorgfältig mit destilliertem Wasser, färbt sie mit Eosin, entwässert und bettet dann in beschriebener Weise ein. Die Kontrastfärbung mittelst

Eosins erlaubt, die Verteilung des in Freiheit gesetzten Eisens mit der Berlinerblaureaktion deutlich nachzuweisen.

Je länger die Schnitte in dem Säurealkohol belassen werden, nachdem bereits die maximale Wirkung eingetreten ist, je größer ist die Menge des durch die Flüssigkeit extrahierten Eisens. Es ist möglich, daß am zehnten Tag überhaupt kein Eisen mehr in den Schnitten vorhanden ist. Es muß hervorgehoben werden, daß das für die in Freiheitsetzung des organischen Eisens gebrauchte Reagens unter Umständen nicht eindeutige Resultate liefert. Allein die Tatsache, daß es das Eisen, das es in Freiheit setzt, auch extrahiert, läßt andeuten, daß etwas von dem extrahierten Eisen an Stellen der Präparate gebracht werden kann, wo es ursprünglich in Form einer organischen Eisenverbindung nicht vorhanden war. Es müssen daher derartige Präparate, in welchen das Eisen entweder durch die Hämatoxylin- oder durch die Berlinerblaureaktion nachgewiesen wird, ein falsches Bild über die ursprüngliche Verteilung des organischen Eisens in den Schnitten geben können. In der Praxis indessen dürfte man, wie die Versuche gezeigt haben, kaum Gefahr laufen, auf Grund dieser Umstände bemerkenswerten Irrtümern zu begegnen. Aber immerhin müssen die Resultate der eben beschriebenen Methode durch solche kontrolliert werden, die man durch verlängerte Einwirkung des Glyzerinreagenzes bei 60°, wie oben beschrieben wurde, erhält. Diese letztere Methode ist die einzige zuverlässige. Es ist notwendig, dies ganz besonders zu betonen, wie wir es übrigens schon wiederholt getan haben[1], denn auf Grund einer vor einigen Jahren veröffentlichten ungenügenden Zusammenfassung unserer Methoden wird das Säurealkoholverfahren häufig in der Literatur als das einzige beschrieben, das wir zum Nachweis der Verteilung des organischen Eisens in Zellen und Geweben gebraucht haben sollen.

Um sich selbst zu überzeugen, daß Eisen in organischer Bindung in den einzelnen Zellen der tierischen und pflanzlichen Gewebe vorhanden ist, und um sich zu vergewissern, daß das ganze Eisen mittelst der Sulfidglyzerinmethode nachgewiesen wird, kann man folgendes Verfahren anwenden: Die Zellen eines in Alkohol gehärteten Präparates werden auf einen Objektträger aus Siliciumglas gebracht und in Alkohol zerzupft. Dann läßt man den Alkohol verdunsten und erhitzt den Objektträger sorgfältig über einer Bunsenflamme, bis die organische Substanz verbrannt ist. Den Objektträger läßt man nun abkühlen und bringt dann auf die Stelle, an der die Verbrennung stattgefunden hat, einen Tropfen einer frisch bereiteten Säureferrocyanidmischung. Wenn man nun den Tropfen unter dem Mikroskop beobachtet, so bemerkt man, daß an denjenigen Stellen, wo sich die Zellen befanden, die Berlinerblaureaktion eintritt.

---

[1]) Vgl. Quart. Journ. of Microsc. Sci. Vol. **38**. p. 175 (1895). *A. B. Macallum*, Die Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung. Ergebnisse der Physiologie. Jahrg. **7**. 589 (1907).

Mittelst dieser Methode kann man auch zeigen, daß die Kerne organisches Eisen enthalten. Die Kerne der Ovarieneier der Amphibien sind so groß, daß man sie aus dem sie umschließenden Zytoplasma isolieren kann. Man legt sie hierzu auf einen Objektträger aus Silicumglas. Es genügt bereits ein Kern, falls er vollständig vom Cytoplasma befreit ist. Um jede fremde Zuführung von Eisen zu verhindern, bedient man sich zu dieser Bloßlegung dünner Gänsekiele oder Glasnadeln. Am Objektträger bringt man vorher an der Unterfläche ein kleines Kreuz (+) an. Diese Marke soll anzeigen, an welcher Stelle die mikroskopisch kleine Menge der Asche, die bei der Veraschung des Kernes hinterbleibt, zu lagern kommt. Man stößt nun den Kern sorgfältig mittelst einer Gänsekielspitze bis an die Stelle der angebrachten Marke und erhitzt dann den Objektträger, sobald die Flüssigkeit verdunstet ist, über einer Bunsenflamme bis zur vollständigen Verbrennung. Nachdem abgekühlt ist, fügt man eine frisch bereitete Säureferrocyanidmischung hinzu. Nach wenigen Minuten tritt an der zu erwartenden Stelle die Berlinerblaureaktion auf.

Man kann diese Probe bei Kernen verschiedener Herkunft anstellen. Es erfordert nur eine gewisse Gewandtheit (die sich übrigens bei einiger Übung bald einstellt), um immer das beschriebene Resultat zu erhalten. Es gelingt auf diese Weise, sogar ein langes Chromatinfäserchen von dem Zellkern einer Speicheldrüse einer Chironomuslarve zu isolieren und, wie wir uns oft überzeugen konnten, in der Asche die Berlinerblaureaktion nachzuweisen.

B. Kalium.

Die organischen Kaliumverbindungen, die für gewöhnlich im Laboratorium dargestellt werden, besitzen das Metall nicht in „maskierter" Form. Das Kalium wird aus ihnen wie ein anorganischer Bestandteil leicht in Freiheit gesetzt. Pyrrolkalium, C_4H_4NK, beispielsweise wird in Gegenwart von Wasser sogleich in Pyrrol und Kaliumhydrat zerlegt und ganz analoge Resultate werden bei Kaliumalkyl- und Arylverbindungen mit den Alkylaten und Arylaten erhalten. In dieser Beziehung besteht zwischen Kalium und Elementen, wie Quecksilber, Magnesium und Eisen ein ausgesprochener Gegensatz. So wird das Quecksilber in *Dimroths* Mercuri-Benzoësäureanhydrid

$$C_6H_4 \begin{matrix} Hg \\ CO \end{matrix} O$$

oder im Mercuri-Nitrophenol von *Hantzsch* und *Auld*[1])

$$C_6H_3 \begin{matrix} \diagup Hg - O \\ \qquad | \\ \diagdown O - NO \end{matrix}$$

durch Natriumhydrat, Kaliumjodid oder Ammoniumsulfid nicht in Freiheit gesetzt.

---

[1]) *A. Hantzsch* und *S. M. Auld*, Über Mercuri-Nitrophenole. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **39**. I. 1105 (1906).

Magnesium wird, nach *Willstätter*[1], im Chlorophyll (Rhodophyllin) sehr energisch zurückgehalten. Jedes Atom Magnesium, welches in diesen Verbindungen mit dem Stickstoff von jedem der zwei Pyrrolringe, wie folgende Formel zeigt, verbunden ist:

$$\begin{matrix}-C\\-C\end{matrix}\!\!>N-Mg-N<\!\!\begin{matrix}C-\\C-\end{matrix}$$

und das einen integrierenden Bestandteil des Chlorophyllmoleküls ausmacht, ist fest gebunden. Die Bindung dieses Magnesiums wird von *Willstätter* ganz ähnlich derjenigen des Eisens im Hämatin formuliert:

$$\begin{matrix}-C\\-C\end{matrix}\!\!>N-\underset{\begin{matrix}|\\OH\end{matrix}}{Fe}-N<\!\!\begin{matrix}C-\\C-\end{matrix}$$

In Ferrocyaniden und in Ferricyaniden ist das Eisen ebenfalls sehr fest gebunden. Es liegt hier wahrscheinlich in folgender Form vor:

$$\begin{matrix}-C\\-C\end{matrix}\!\!>Fe=Fe<\!\!\begin{matrix}C-\\C-\end{matrix} \quad \text{oder} \quad \begin{matrix}-C\\-C\end{matrix}\!\!>Fe-Fe<\!\!\begin{matrix}C-\\C-\end{matrix}$$

Die Festigkeit der Bindung des Quecksilbers, Magnesiums und Eisens in den erwähnten Verbindungen und die mutmaßliche Art ihrer Bindung deuten an, daß Di- und Polyvalenz Hauptfaktoren für das Zustandekommen maskierter Verbindungen sind und daß diese Faktoren in der Weise wirken, daß sie „sterische Hinderung" hervorrufen, welche das Quecksilber-, Magnesium- oder Eisenatom gegenüber den Angriffen der Reagenzien, die gewöhnlich zu ihrem Nachweis benutzt werden, schützt. Wenn diese Erklärung über die „maskierte" Bindung richtig ist, so ist daraus zu folgern, daß unmöglich irgend ein monovalentes Element der Kationenreihe eine organische Verbindung zu bilden vermag, in der es durch die gewöhnlich gebrauchten Reagenzien nicht nachgewiesen werden könnte; demnach würde auch die Möglichkeit der Existenz einer solchen Verbindung mit Kalium ausgeschlossen sein. Diese Tatsache, daß wir keine derartigen Kaliumverbindungen kennen, dürfte vielleicht schon genügen, die obige Schlußfolgerung praktisch als richtig anzusehen.

Diese Annahme ist für die mikrochemischen Studien des Kaliums in tierischen und pflanzlichen Zellen von Bedeutung. Das Fehlen von Beweisen über das Vorkommen von „maskierten" organischen Kaliumverbindungen, ferner die Schwierigkeit, mit der man die Bildung solcher Verbindungen erklären könnte, machen es jedenfalls sehr unwahrscheinlich, daß sie unter den Produkten lebender Wesen vorkommen. Solange nicht irgend eine Andeutung über die Existenz derartiger Verbindungen vorliegt, dürfte als sicher anzunehmen sein, daß das Kalium in den Zellen und Geweben mittelst der mikrochemischen Methode unmittelbar nachweisbar ist. Dieser Umstand gestattet den Nachweis des Kaliums in Zellen und Geweben ver-

[1]) *Willstätter*, Über die Bindung des Eisens im Blutfarbstoff. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. 42. III. 3985 (1909).

hältnismäßig leicht. Möge das Kalium in ihnen in organischer oder in anorganischer Form vorhanden sein, so läßt es sich doch jedenfalls in üblicher Weise unmittelbar auffinden. Die einzige Schwierigkeit besteht darin, daß die Kaliumsalze sehr schnell diffundieren. Man muß daher alle Prozesse, die zum Nachweis nötig sind, so ausführen, daß die Diffusion auf ein Minimum eingeschränkt wird.

Zum Nachweis des Kaliums gebrauchen wir das Kobaltnatriumhexanitrit, $CoNa_2(NO_2)_6$. Fügt man eine Lösung dieser Verbindung zu einer Kaliumsalzlösung, so entsteht sofort eine orangefarbige Fällung. Die Zusammensetzung des erhaltenen Niederschlages kann entsprechend der Konzentration der beiden Lösungen etwas verschieden sein; aber er besteht immer aus dem Hexanitrit des Kobalts, Natriums und Kaliums.

Diese Reaktion wurde zuerst im Jahre 1881 von *de Koninck*[1]) und *Curtman*[2]) zum Nachweis des Kaliums vorgeschlagen. Der erstere, welcher eine 10%ige Natriumnitritlösung unter Zusatz von etwas Kobaltchlorid und Essigsäure benutzte, fand, daß diese Fällungsprobe auf Kalium empfindlicher ist als diejenige mit Platinchlorid. Er stellte ferner fest, daß auch mit Ammoniumsalzen eine ähnliche, allerdings viel weniger empfindliche Reaktion eintritt, daß dagegen die Salze des Magnesiums, Calciums, Baryums, Strontiums und Eisens nicht reagieren. Er gab auch an, daß man mittelst Kaliumchlorids bei einer Verdünnung von 1 zu 2000 keinen Niederschlag mehr erhält. *Curtman* beobachtete gleichfalls, daß das Kobaltnatriumhexanitrit mit Lithium, Magnesium, Baryum, Strontium oder Calcium keinen Niederschlag liefert, daß es dagegen mit Ammoniak, Rubidium, Cäsium und besonders mit Kalium bei Gegenwart von Sulfaten, Phosphaten, Nitraten, Acetaten und Chloriden Fällung erzeugt, und daß nur die Gegenwart von Jod und Jodiden für die Bildung dieses Niederschlages hinderlich ist.

Billmann[3]) hat im Jahre 1910 gefunden, daß man mittelst eines besonders zweckmäßig präparierten Reagenzes das Kalium noch niederschlagen kann, wenn das Chlorid, in einer zweifach normalen Natriumchloridlösung, in einer Verdünnung von 1 zu 27.568 vorhanden ist, während man noch 1 Teil Kalium in Gegenwart von 4000 Teilen Natrium in einer 10%igen Lösung von Natriumchlorid nachzuweisen imstande ist. Im ersteren Falle würde das Reagens noch 1 Teil Kalium in 52.560 Teilen Lösung anzeigen. *Adie* und *Wood*[4]) untersuchten ebenfalls das Kobaltreagens auf seine Empfindlichkeit gegenüber Kaliumlösungen. Sie fanden, daß die Löslichkeit des Niederschlages, dem sie die Zusammensetzung $CoNaK_2(NO_2)_6H_2O$ gaben, in einer 10%igen Essigsäurelösung geringer als 1 zu 20.000 ist.

---

[1]) *L. L. de Koninck*, Neue Reaktion auf Kali. Zeitschrift f. analytische Chemie **20**. 390 (1881).

[2]) *C. Curtman*, Natriumkobaltnitrit als Reagens auf Kalium. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **14**. 1951 (1881).

[3]) *Billmann*, Über die Darstellung des Natriumkobaltnitrits und seine Anwendung zum Nachweis von Kalium. Zeitschrift f. analytische Chemie **39**. 284 (1900).

[4]) *Adie* and *Wood*, Journal of Chem. Soc. **77**. 1076 (1900).

Ein Jahr später bediente sich *van Leent*[1]) des erwähnten Reagenzes zur Bestimmung des Kaliums im Meerwasser. Nach ihm wird das Kalium aus dem Wasser mittelst des Kobaltreagenzes als Hexanitrit des Kobalts, Natriums und Kaliums niedergeschlagen. Das Kalium wird dabei in Perchloratform angenommen. Die erhaltenen Resultate stimmten sehr gut mit denjenigen überein, welche die Bestimmungen mittelst Platinchlorids ergeben hatten. *Autenrieth* und *Bernheim*[2]) studierten die Zuverlässigkeit des Kobaltreagenzes durch Versuche mit Kaliumchloridlösungen von bekanntem Gehalt und erhielten dabei außerordentlich gut stimmende Werte. Sie gebrauchten dann das Reagens zur Bestimmung des Kaliums im Urin und gelangten dabei ebenfalls zu befriedigenden Resultaten. Nach *Drushel*[3]) endlich leistet das Reagens ausgezeichnete Dienste zur Bestimmung des Kaliums sowohl bei gewöhnlichen Analysen als auch bei der Untersuchung tierischer Flüssigkeiten.

Für den Nachweis des Kaliums in lebenden Geweben auf mikrochemischem Wege wurde die Kobaltnatriumnitritverbindung zuerst von *A. B. Macallum*[4]) gebraucht. Er benutzte ein Präparat, das eine Modifikation des von *Erdmann*[5]) empfohlenen Reagenzes darstellte. Zu seiner Gewinnung werden 20 *g* Kobaltnitrit[6]) und 35 *g* reinen Natriumnitrits in 75 cm^3 verdünnter Essigsäure gelöst (10 cm^3 Essigsäure auf 75 cm^3 verdünnt). Es findet dabei eine lebhafte Entwicklung von Stickstoffperoxyd statt. Enthält das verwendete Natriumnitrit Spuren von Kaliumsalz beigemischt, so tritt nach Verlauf einiger Stunden Abscheidung von Kobalt-Natrium-Kaliumhexanitrit ein, das durch Filtration entfernt wird. Das Filtrat wird dann auf 100 cm^3 aufgefüllt und in einer mit gut schließenden Glasstopfen versehenen Flasche aufbewahrt. Um das Reagens möglichst lange Zeit empfindlich zu erhalten, bewahrt man es im Eisschrank auf.

Macallum fand, daß dieses so dargestellte Präparat in einer 1%igen Kochsalzlösung noch 1 Teil Kalium in 70.000 Teilen der Lösung augenblicklich niederschlägt, und daß unter dem Mikroskop sogar ein kristallinischer Niederschlag bei einer Verdünnung von 1 zu 255.000 derselben Kochsalzlösung beobachtet wird. Bei solchen Verdünnungen beträgt das Volumen des erforderlichen Reagenzes neun Zehntel.

---

[1]) *Van Leent*, Über die Abscheidung und Bestimmung von kleinen Mengen Kalium in Salzgemischen. Zeitschrift f. analyt. Chemie. **40**. 569 (1901).

[2]) *W. Autenrieth* und *Bernheim*, Über eine einfache Methode der Bestimmung des Kaliums im Harn. Zeitschrift f. physiol. Chemie. **37**. 29 (1902).

[3]) *W. A. Drushel*, Die volumetrische Bestimmung von Kalium als Kobaltnitrit. Zeitschrift f. anorg. Chemie. **56**. 223. 1908. — Die Anwendung der Kobaltnitritmethode zur Bestimmung des Kaliums in Böden. Ebenda. **59**. 97. 1908 und **61**. 137.

[4]) *A. B. Macallum*, On the distribution of potassium in animal and vegetable cells. Journ. of Physiol. **32**. 95 (1905).

[5]) *H. Erdmann*, Lehrbuch der anorganischen Chemie. 1898. S. 630.

[6]) Das von mir für die Bereitung des Reagenzes gebrauchte Kobaltnitrit stammte von *Baker* und *Adamson* Chemical Co., Easton, Penn., U. S. A.

Wird eine geringe Menge dieses Reagenzes zu einer Kaliumlösung gefügt, so entsteht sogleich ein orangegelber Niederschlag, der Kristalle von dodekaedrischer Form in wechselnder mikroskopischer Größe und von chromgelber Farbe bildet. Die Zusammensetzung dieses Niederschlages wechselt etwas mit der Zusammensetzung der zu untersuchenden Kaliumsalzlösung. *Gilbert*[1]), der die Zusammensetzung des natriumhaltigen Niederschlages genau untersuchte, fand, daß die Menge des Natriums von der Konzentration der Lösung abhängig ist. Er brachte für die Fällung folgende Formulierung in Vorschlag: $Co(NO_2)_3 . 3(K\,Na)NO_2 . n\,H_2O$, wobei der Wert für n entweder $1^1/_2$ oder $2^1/_2$ beträgt.

Der Niederschlag ist nur sehr wenig löslich in kaltem Wasser; er löst sich aber in Natriumnitritlösungen auch bei Gegenwart von Natriumacetat. Er löst sich nicht in verdünnten Lösungen des Niederschlagsreagenzes und in 80%igem Alkohol, mit welchem man den Niederschlag zur Befreiung von Spuren des Kobaltdoppelsalzes waschen kann. Es wurde ferner gefunden, daß der Niederschlag unlöslich ist in Lösungen von Kaliumnitrit. Das letztere kann jedoch zur Reinigung der Fällung nur dann gebraucht werden, nachdem bereits jede Spur der Natriumverbindung, $CoNa_3(NO_2)_6$, entfernt ist, da natürlich das letztere zu weiterer Niederschlagsbildung beitragen würde. Das Fällungsreagens ist selbst außerordentlich leicht löslich und infolgedessen wird es aus dem Niederschlage sehr schnell durch Waschen mit Wasser entfernt. Wenn man eiskaltes Wasser zum Auswaschen benutzt, so ist die Menge des in Lösung gehenden Niederschlages nur äußerst gering. Man kann sich daher zur Entfernung von Spuren des nicht mit Kalium verbundenen Kobaltsalzes sehr kalten Wassers bedienen. Nach *Drushel* soll hingegen zum Auswaschen des Niederschlages zwecks Entfernung des Reagenzes eine halbgesättigte Kochsalzlösung dem kalten Wasser vorzuziehen sein, da, wie er behauptet, sich doch 1 Teil des Niederschlages in 25.000—30.000 Teilen Wasser bei Zimmertemperatur löst.

Das Kobaltreagens fällt ebenfalls, aber weniger leicht, Ammoniak aus seinen Lösungen. Die Kristalle der Ammoniumverbindung ähneln in Form und Größe außerordentlich denjenigen des Kaliumsalzes, von dem sie sich aber durch größere Löslichkeit auszeichnen. Auf Grund der bemerkenswerten Löslichkeit des Ammoniumsalzes selbst in eiskaltem Wasser wird es auch nur unvollständig aus seinen Lösungen niedergeschlagen. Aus einem Gemisch des Kalium-Natrium-Kobaltsalzes und des Ammoniumdoppelsalzes kann man das letztere einfach durch Behandeln mit eiskaltem Wasser entfernen.

Die Tatsache, daß Ammoniumverbindungen mit dem Kobaltreagens einen Niederschlag liefern, ließ es nicht unmöglich erscheinen, daß auch Aminosäuren und Amide mit dem Reagens in ähnlicher Weise reagieren. Man fand jedoch, daß weder Glykokoll, Taurin, Leucin, Tyrosin, Sarkosin, Glukosamin, Asparaginsäure noch Glutaminsäure mit dem Kobaltdoppel-

---

[1]) *Gilbert*, Die Bestimmung des Kaliums nach quantitativer Abscheidung desselben als Kaliumnatriumkobaltnitrit. In.-Diss. Tübingen 1898.

salz einen Niederschlag geben. Außerdem bildet es weder mit Harnstoff, Asparagin, Alloxan, Allantoin, Guanidin noch mit den Purinkörpern unlösliche Salze. Anders verhält sich dagegen das Kreatin. Es wird von dem Kobaltsalz noch aus 0·4%iger Lösung sogleich niedergeschlagen und aus 0·2%iger Lösung nach Verlauf weniger Minuten gefällt. Der Kreatinniederschlag bildet orangegelb gefärbte Kristalle, die in jeder Hinsicht dem Kaliumkobaltnatrium ähneln. Kreatinin und Cholin geben dagegen, selbst in konzentrierten Lösungen, keine Fällung. Oxalsäure und Oxalatlösungen liefern auf Zusatz eines Kobaltsalzes fast augenblicklich einen Niederschlag. Dieser Umstand ist bei Untersuchung von pflanzlichen Flüssigkeiten von Bedeutung. Da die letzteren auch Oxalate enthalten, so ist es bei der Analyse von Pflanzengeweben oft erforderlich, unterscheiden zu können, ob die erhaltene Kobaltfällung ein Kaliumsalz oder Kobaltoxalat darstellt. Diese Beurteilung ist sehr leicht, denn Form und Farbe der Kristalle der beiden Verbindungen sind ganz verschieden. Man kann außerdem eine Kontrolle auch dadurch ausführen, daß man eine Probe des zu untersuchenden Pflanzenmaterials mit einer einfachen Lösung von Kobaltacetat behandelt. Wenn auf diese Weise die Stelle, an der sich nur Oxalat befindet, nachgewiesen ist, kann man dann durch Vergleich mit anderen Präparaten, die mit dem Doppelsalz, $CoNa_3(NO_2)_6$, behandelt worden sind, bestimmen, wo in den betreffenden Präparaten Kaliumsalze und wo Oxalate auftreten. Jedenfalls bietet in der Regel die Anwesenheit von Oxalsäure und Oxalaten keine Schwierigkeiten, denn sie sind in den Zellen nur in äußerst geringen Mengen vorhanden, während das Kalium fast immer recht reichlich vertreten ist, selbst auch im Gefäßfasergewebe. Man kann infolgedessen für gewöhnlich die Oxalate unberücksichtigt lassen.

Als einzige organische Verbindung, die mit dem Kobaltreagens einen Niederschlag liefert, der zur Verwechslung mit dem Kaliumsalz führen könnte, ist (bisher) also nur das Kreatin zu betrachten. Was die Menge des Kreatins in tierischen Präparaten betrifft, so sei hier angeführt, daß die in den Muskeln von Vertebraten vorhandene Menge eine sehr verschiedene sein kann. Im Froschmuskel sind 0·21—0·39%[1]) und in Muskeln des Kaninchens 0·4% enthalten. Nach *Valenciennes* und *Fremy*[2]) findet sich in den Muskeln von Mollusken Kreatin nur in spärlichen Mengen vor. Sie fanden es auch in den Muskeln der Crustaceen. Nach *Krukenberg*[3]) dagegen ist in den Muskeln der Avertebraten überhaupt kein Kreatin vorhanden und *Henze*[4]) konnte davon auch keine Spur in den Muskeln

---

[1]) *F. Nawrocki*, Über die quantitative Bestimmung des Kreatins in Muskeln. Zeitschr. f. analyt. Chemie. **4**. 330 (1865).

[2]) *Valenciennes* und *Fremy*, Recherches sur la composition des muscles dans la série des animaux. Comptes Rendus. **41**. 753 (1865).

[3]) *Krukenberg*, Vergleichende Physiologische Vorträge. Heidelberg 1866. S. 316. Derselbe, Untersuchungen aus dem Physiolog. Institut der Universität Heidelberg. III (1880) und IV (1881).

[4]) *Martin Henze*, Beiträge zur Muskelchemie des Octopoden. Zeitschrift f. physiol. Chemie. **43**. 477 (1905).

von **Octopus** nachweisen. *A. B. Macallum* konnte es ebensowenig in den Muskeln des Hummers und der Krabbe auffinden.

Da der mit dem Kobaltdoppelsalz, $CoNa_3(NO_2)_6$, erzeugte Kreatinniederschlag viel leichter löslich ist als die Kaliumverbindung, so kann man aus Muskelfasern, in denen man eine Fällung vorgenommen hat, das Kreatinsalz, zum größten Teile wenigstens, durch häufiges Waschen mit eiskaltem Wasser entfernen. Das letztere ist jedoch bei Untersuchung von Muskelfasern der Vertebraten nicht unbedingt nötig, denn das Kreatin und Kalium finden sich in diesen Geweben in ganz ähnlicher Weise verteilt.

Die Form der Kristalle und die orangegelbe Farbe des Kaliumsalzes erleichtern seinen Nachweis außerordentlich, wenn es in den zu untersuchenden Geweben in bemerkenswerten Mengen vorhanden ist. Wenn es dagegen in sehr geringen Mengen oder nur in Spuren in einem Gewebe oder in einer Zelle auftritt, bleibt der kristallinische Niederschlag aus und es ist auch möglich, daß selbst keine gelbe Färbung zu beobachten ist. Man muß daher dann eine etwas andere Methode anwenden, um die Gegenwart des Kobaltsalzes deutlich nachweisen zu können. Eine solche Methode wurde von *Macallum* aufgefunden. Sie besteht in der Anwendung einer sauren Ammoniumsulfidlösung (1 Teil Sulfidreagens und 1 Teil Wasser), die mit dem Kobalt augenblicklich unter Bildung von schwarzem Kobaltsulfid reagiert. Wenn also nach solcher Behandlung in einem Gewebe die schwarze Fällung auftritt, so ist dadurch bewiesen, daß Kaliumsalz vorhanden war. Da der schwarze Niederschlag sehr leicht wahrzunehmen ist, so ist es daher auch nicht schwer, sich über Vorkommen und Verteilung selbst von Spuren von Kalium zu vergewissern.

Das Kobaltreagens muß bei der Untersuchung von Zellen und Geweben in der Weise gebraucht werden, daß es auf einmal in alle Teile der betreffenden Präparate eindringen kann. Bei einzelligen Organismen, wie bei Infusorien oder Hefezellen, ist dies leicht zu bewerkstelligen. Die Flüssigkeit, in der sie sich befinden, wird mit ungefähr zwei Volumina des Reagenzes gemischt und die Masse dann wenigstens eine halbe Stunde, aber nicht länger als zwei Stunden, stehen gelassen. Durch diese Behandlung wird die erwünschte Wirkung die Zellen zu fixieren, erreicht. Das Eindringen des Reagenzes und die Fällung des Kaliumsalzes sind bereits in weniger als $^1/_2$ Minute, in einigen Sekunden, vollständig erfolgt. Die Mischung wird nun ungefähr fünf Minuten lang zentrifugiert[1]), dann wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen, mit eiskaltem Wasser versetzt, wieder drei Minuten lang zentrifugiert, worauf die Flüssigkeit wieder abgegossen wird. Dieser Prozeß wird 4- oder 5mal wiederholt. Wenn dann das Kobaltreagens auf diese Weise völlig entfernt worden ist, wird der Niederschlag mit der 5- oder 6fachen Menge seines Volumens absoluten Alkohols übergossen und zur vollständigen Härtung so

[1]) Zu diesem Zwecke genügt eine kleine Zentrifuge, wie man sie zur Trennung des Salzes und der Kristalle im Urin benutzt.

1 Tag stehen gelassen. Man saugt dann mittelst einer Pipette einen kleinen Teil des Niederschlages auf und bringt davon ein wenig auf einen Glasobjektträger; hierauf wird mit einem Tropfen einer Mischung gleicher Vol. unverdünnten Glyzerins und konzentrierten Ammoniumsulfids[1]) versetzt, gut durcheinandergerührt und endlich mit dem Deckgläschen zugedeckt. Das Präparat kann jetzt auf die Verteilung des Kaliums geprüft werden, das durch das Vorhandensein des Kobaltsulfides nachgewiesen wird. Wenn das Präparat vor störenden äußeren Einflüssen (Staub) geschützt ist, so kann es monatelang unverändert aufbewahrt werden.

Bei Untersuchung faserartiger Algen verfährt man so, daß man sie mit einer Zange aus ihrer Flüssigkeit entnimmt und sofort in das Reagens legt, wo man sie $^1/_2$ Stunde lang beläßt. Dann wäscht man sie wiederholt mit eiskaltem Wasser, bis sie vom Reagens vollständig befreit sind. Zum Einlegen ins Wasser und zum Herausnehmen bedient man sich wieder der Zange. Die Fäserchen werden jetzt auf dem Objektträger in Wasser auseinandergezupft, worauf dieses schnell durch Abtupfen mit Filtrierpapier entfernt wird. Nachdem man noch einen Tropfen der Glyzerinmischung zugefügt hat, wird das Präparat mit dem Deckgläschen bedeckt. In der eben beschriebenen Weise kann man die ziemlich häufig in Kolonien solcher fadenartiger Algen vereinigt auftretenden Vorticellen präparieren, um in ihnen die Verteilung des Kaliums nachzuweisen.

Liegen Spermatozoen von Vertebraten zur Untersuchung auf Verteilung des Kaliums vor, so kann man die Präparation in der folgenden besonderen Weise vornehmen. Man mischt den frischen Samen schnell und vollständig mit dem Reagens, und zwar mit der 3fachen Menge seines Volumens und rührt die Menge $^1/_2$ Stunde lang mit einem Glasstab durcheinander. Das Reagens wird nun mittelst einer Saugpumpe auf einem gehärteten Filter und auf einem fein durchlöcherten Platinkonus abfiltriert. Dann wäscht man das Präparat auf dem Filter wiederholt mit eiskaltem Wasser aus, bis das Filtrat keine Kobaltreaktion mehr zeigt. Nachdem man hierauf das Absaugen unterbrochen hat, wird eine Mischung gleicher Teile Glyzerin und Ammoniumsulfid auf das Filter gegossen und dann ein Teil der Masse sorgfältig auf einen Objektträger gebracht, in einem Tropfen der Mischung ausgezupft und endlich mit dem Deckgläschen bedeckt. Nach dieser Methode erhält man sehr interessante und einzigartige Präparate.

Für die Untersuchung von Geweben und vielzelliger Präparate muß man sich einer anderen Methode bedienen. Das Reagens muß so bald wie irgend möglich mit den einzelnen Zellen und Bestandteilen des betreffenden Gewebes in Berührung gebracht werden, um Diffusion und Verteilung der Kaliumsalze zu verhindern oder wenigstens auf ein Mindestmaß zu beschränken. Für diesen Zweck bringt man gewöhnlich das zu untersuchende Gewebe mit einer kleinen Menge des Reagenzes auf ein Uhrglas und zupft

[1]) Das Verfahren zur Darstellung dieser Lösung vgl. S. 1109.

es hier gut auseinander. Nachdem das Reagens ½ Stunde auf die isolierten Fasern eingewirkt hat, gießt man den Überschuß der Kobaltlösung ab und fügt eiskaltes Wasser hinzu. Nach 5 Minuten wird dies ebenfalls abgegossen und durch frisches eiskaltes Wasser ersetzt. Man wiederholt diese Operation 4—5mal oder bis das Waschwasser endlich farblos erscheint, d. h. bis es auf Zusatz einiger Tropfen Ammoniumsulfids keine Reaktion auf Kobalt mehr gibt. Das rückständige Zellenmaterial wird dann mit einer Pipette aufgesaugt und auf einen Objektträger gebracht; man versetzt hierauf mit einem Tropfen der Glyzerin-Ammoniumsulfidmischung, bedeckt mit einem Deckgläschen und untersucht.

Liegen einzellige Organismen vor, so verliert man durch das beschriebene Dekantieren mit Wasser einen großen Teil der kleineren Gewebspartikelchen. Um dies zu verhüten, kann man sich mit Vorteil einer Zentrifuge bedienen. Durch wiederholtes Zentrifugieren mit eiskaltem Wasser, das nach jeder Drehungsperiode, die 3—5 Minuten lang dauern soll, erneuert wird, erhält man schließlich ein Sediment, von dem man mittelst der Pipette genügend charakteristische Gewebsproben zum Einlegen in die Glyzerinsulfidmischung entnehmen kann.

Nach der beschriebenen Methode kann man in den isolierten Zellen und Gewebsteilen ziemlich genau die Verteilung der Kaliumsalze bestimmen. Aber wenn die Präparate als gänzlich typisch (natürlich) gelten sollen, so kann man gegen die erwähnte Art der Präparierung einen ernsthaften Einwand erheben: auf der Oberfläche der isolierten Zellen und Fasern hat nämlich das Fluidum nicht dieselbe Zusammensetzung wie die normale Lymphe, welche die Oberfläche der intakten Gewebe und Organe während des Lebens umgibt. Physikalische Bedingungen, vor allem Oberflächentensionen, verursachen Lösungsverdichtungen, auch solche der Kaliumsalzlösungen auf der äußersten Oberfläche des Zellgewebes. Eine derartige Verdichtung kann nur selten in den ausgezupften Geweben nachgewiesen werden. Dieser Einwand kann nicht gegen solche Schnitte frischen Gewebes erhoben werden, die mit dem Gefriermikrotom geschnitten und noch im gefrorenen Zustande in das Kobaltreagens gebracht worden sind. Bei diesem Verfahren wird die Diffusion der Lösungen vor dem Eindringen des Reagenzes sehr beträchtlich vermindert oder überhaupt vollständig verhindert, denn das Reagens dringt augenblicklich in alle Teile der Schnitte ein. Solche Präparate, welche die Verteilung der Kaliumsalze zeigen, können nicht nur innerhalb, sondern auch außerhalb der Zellen erhalten werden, und zwar in einer Weise, daß auch die örtliche Konzentration beobachtet werden kann, die nach dem *Gibbs-Thomson*schen Lehrsatz, d. h. auf Grund der Adsorption oder Oberflächenkondensation von Lösungen, dank der Oberflächenspannung, stattfindet.

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit (vgl. S. 1100) gezeigt worden ist, kann mittelst des Gefrierprozesses, nach theoretischen Gründen, eine geringe Veränderung in der Verteilung der Salze in einem Zellgefüge hervorgerufen werden; praktisch ist aber eine solche Verteilungsänderung nicht

oder höchstens in einem so geringen Maße nachgewiesen worden, daß derartige Präparate als einwandfrei angesehen werden können.

Auf Grund der Vorteile, welche die Gefriermethode für die Demonstrierung der Kaliumsalze in Geweben und Organen bietet, ist sie jedenfalls dem Verfahren, bei dem die Gewebselemente ausgezupft werden, ehe sie der Wirkung des Kobaltreagenzes unterliegen, bei weitem vorzuziehen.

Mit derart präparierten Schnitten hat *Macallum* den *Gibbs-Thomson*schen Satz bei Vorgängen des Lebensphänomens untersucht. Er stellte die bei seinen Untersuchungen gebrauchten gefrorenen Schnitte in folgender Weise dar: Das Messer, das dabei benutzt wird, kühlt man unter 0° C ab — je niedriger dabei die Temperatur ist, um so besser. Zu diesem Zweck bespritzt man es mit flüssiger Kohlensäure oder mit etwas flüssiger Luft. Ein Stück des zu untersuchenden gänzlich frischen Gewebes oder Organes wird jetzt auf die Platte des Kohlensäure-Gefriermikrotoms [1]) gebracht und mit Kohlensäure so lange behandelt, bis das Gewebe ganz fest gefroren ist. Nun schneidet man und bringt die Schnitte sogleich — während sie noch fest gefroren sind — in das Reagens. Das Messer muß eine Temperatur unter 0° haben, damit die Schnitte darauf flach liegen und flach bleiben können, bis sie in das Reagens eingelegt werden. Sollte während des Schneidens die Temperatur des Messers über 0° C steigen, so müßte man sofort wieder abkühlen, ehe man weitere Schnitte ausführt. Wenn ein Schnitt sich zusammenzieht (zusammenrollt), ist er nahe am Schmelzpunkt: dann kann, noch ehe er mit dem Reagens zusammenkommt, eine Veränderung in der Verteilung seiner Salze vor sich gehen, besonders kann Diffusion der Kalisalze über die geschnittene Oberfläche stattfinden. Derartige Schnitte müssen verworfen werden. Man sollte nur solche benutzen, die, wie wir schon erwähnten, flach und gefroren in das Reagens gebracht werden können.

Man läßt die Schnitte nun für mindestens 1/2 Stunde oder für einige Stunden in dem Reagens liegen. Der größte Teil des Reagenzes wird dann mittelst einer Pipette abgesaugt. Man fügt eiskaltes Wasser hinzu und rührt nun die Schnitte herum. Man entfernt es dann in vorerwähnter Weise, setzt frisches eiskaltes Wasser hinzu und beseitigt dieses wieder nach 3—5 Minuten. Dieser Prozeß wird 5- oder 6mal wiederholt. Das Auswaschen soll aber im ganzen nicht mehr als 20 Minuten in Anspruch nehmen: dies genügt vollständig, um selbst die geringsten Spuren des Reagenzes zu entfernen.

Die Schnitte werden jetzt sofort flach auf einen gläsernen Objektträger gebracht und in einen Tropfen einer Mischung gleicher Teile Glyzerins und Ammoniumsulfids eingebettet. Nachdem man dann mit einem Deckgläschen bedeckt hat, kann das Präparat untersucht werden. Die Präparate können unbeschränkte Zeit lang aufbewahrt werden, wenn die Ränder

[1]) Das Kohlensäure-Gefriermikrotom, das vom Verfasser gebraucht wird, stammt von der Firma Jung in Heidelberg.

der Deckgläschen mit dem Objektträger sorgfältig mittelst einer Lösung von hartem Balsam in Benzol verkittet worden sind. Nach Verdunstung des Benzols bildet der Balsam an den Rändern des Präparates einen festen, luftdichten Überzug.

Die Gefriermethode wurde bisher angewandt zum Studium der Verteilung des Kaliums in Muskeln (Herzmuskeln, gestreift und glatt) im Nervengewebe (Rinde des Großhirns und Kleinhirns, Rückenmark, Schädel- und Spinalganglien), in Leber, Pankreas, Niere, Milz, Schilddrüse, Ovarium, Hoden und Nebennieren von Wirbeltieren und in Cotyledonen, Stengeln und Wurzeln von Pflanzen. Die dabei erhaltenen Resultate sind außerordentlich interessant.[1])

C. Calcium.

Calcium kann als zweiwertiges Element zweifellos sowohl in organischer oder „maskierter" Verbindung als auch in anorganischer Form in Geweben auftreten. Das Vorkommen in organischer oder maskierter Bindung ist im Vitellin, dem Hämatogen von *Bunge*, der darin neben Calcium auch Eisen fand, nachgewiesen worden — ein Befund, der von *Hugounenq* und *Morel*[2]) bestätigt wurde. *Miescher*[3]) behauptet, daß die eigentümliche, eisenhaltige Substanz Karyogen, die er aus den Köpfen der Spermatozoen des Salms isoliert hat, das Calcium ebenfalls als fest gebundenen Bestandteil enthält. Calcium ist ferner in zahlreichen Nucleoproteiden aufgefunden worden. Es ist hier an die Nucleinoxydase der Leber zu erinnern, die von *Spitzer*[4]) extrahiert wurde, an das aus der Niere von *Lönnberg*[5]) isolierte Nucleoproteit und an das von *Halliburton*[6]) ebenfalls aus der Niere erhaltene Nucleoalbumin. In der Asche all dieser Substanzen ist Calcium aufgefunden worden.

Bietet das Vorkommen von derartigen maskierten Bindungen schon an und für sich eine Schwierigkeit für den Nachweis der Verteilung des Calciums in Tier- und Pflanzenzellen, so wird dieselbe hier noch ganz bedeutend durch den Umstand erhöht, daß uns unter dem Mikroskop auch für das anorganische Calcium keine sehr empfindliche Reaktion zu Gebote steht. Die empfindlichsten und gleichzeitig die fast augenblicklich vor sich

---

1) Diese Ergebnisse werden nächstens veröffentlicht.

2) *Hugounenq* und *Morel*, Recherches sur l'hématogène. Comptes Rendus. **140**. 1065 (1905).

3) *F. Miescher*, Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. Bearbeitet und herausgegeben von *O. Schmiedeberg*. Arch. f. experiment. Pathol. u. Pharmak. **37**. 100 (1906).

4) *Spitzer*, Die Bedeutung gewisser Nucleoproteide für die oxydative Leistung der Zelle. Arch. f. d. ges. Physiol. **67**. 615 (1896).

5) *Ingolf Lönnberg*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper der Nieren und der Harnblase. Skandin. Arch. f. Physiol. **3**. 1 (1901).

6) *W. D. Halliburton*, The proteids of kidney and liver cells. Journ. of Physiol. **13**. 807 (1892).

gehenden Reaktionen auf Calciumsalze im Reagenzglas sind die mittelst der Fluoride, die noch 1 *mg* Calcium in 122.700[1]) Teilen Wasser bei 18° niederschlagen. Als Karbonat wird 1 *mg* Calcium in 192.300[2]) Teilen Wasser bei der erwähnten Temperatur gefällt und das Oxalat ist nach den Beobachtungen von *Holleman*, *Kohlrausch* und *Rose*[3]) über die elektrische Leitfähigkeit so schwer löslich, daß nur 1 *mg* Calcium von 653.600 Teilen Wasser bei 18° gelöst wird, während nach den Angaben von *Herz* und *Mühs*[4]) bei 26—27° 107.300 Teile Wasser 1 *mg* Ca in Form des Oxalats lösen. Alle diese Niederschläge sind weiß oder farblos und infolgedessen leisten sie unter dem Mikroskop keine großen Dienste, wenn das Calciumsalz nicht so reichlich vorhanden ist, daß es in Form eines deutlich kristallinischen oder körnigen Niederschlages auftritt. Es ist außerdem auch kein Calciumdoppelsalz bekannt, das unlöslich und gefärbt ist, oder das durch nachfolgende Behandlung in ein geeignetes gefärbtes Produkt übergeführt wird, wie es beim Kalium mittelst der Kobaltreaktion geschehen kann.

Calciumsalze verändern wohl die Farbe einer frisch bereiteten wässerigen Lösung reinen Hämatoxylins. Die dabei entstehende rote Verbindung ist aber leicht löslich. Diese Reaktion ist als Reagenzglasprobe sehr empfindlich und sie kann auch zum Nachweis von Calciumsalzen in lebenden Zellen benutzt werden; da aber das Reagens in ähnlicher Weise von Alkalien und ihren Karbonaten beeinflußt wird, so kann diese Probe durchaus nicht als eine für Calcium eigentümliche Reaktion gelten. Außerdem muß das Calciumsalz, um mit dem Hämatoxylin reagieren zu können, in Lösung vorliegen und infolgedessen kann bereits vor der Einwirkung auf Hämatoxylin Diffusion stattfinden, die übrigens durch den Zusatz des Reagenzes noch erhöht wird. Die in lebenden Zellen und Geweben mit Hämatoxylin erhaltene Farbreaktion bietet demnach durchaus keinen bestimmten Anhaltspunkt für die ursprüngliche Verteilung der Calciumsalze. Wenn außerdem das Calcium in einer unlöslichen Form als Oxalat, Karbonat, Fluorid oder Phosphat in den Zellen vorhanden ist, so reagiert es mit der hinzugefügten Lösung des Hämatoxylins nur sehr langsam, und das leicht lösliche rotgefärbte Reaktionsprodukt entfernt sich durch Diffusion von seinem Entstehungsorte.

---

[1]) Berechnet aus der Leitfähigkeitsbestimmung von *Kohlrausch* und *Rose*, Löslichkeit einiger schwerlöslicher Körper im Wasser, beurteilt aus der elektrischen Leitungsfähigkeit der Lösungen. Zeitschrift f. physikal. Chemie. **12**. 234 (1893); *F. Kohlrausch*, Die Löslichkeit einiger schwerlöslicher Salze im Wasser bei 18°. **50**. 356 (1905).

[2]) Berechnet nach den Resultaten von *Kohlrausch* und *Rose*, Löslichkeit einiger schwerlöslicher Körper im Wasser, beurteilt aus der elektrischen Leitungsfähigkeit der Lösungen. Zeitschr. f. physik. Chemie. **12**. 234; loc. cit.

[3]) Berechnet nach den Resultaten von *Holleman*, *Kohlrausch* und *Rose*, Zeitschr. f. physik. Chemie. **12**. 129 und 241; loc. cit.

[4]) Berechnet aus den Bestimmungen nach *Herz* und *Mühs*, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. **36**. 3715 (1903).

Eine spezielle, charakteristische Farbreaktion für den vorliegenden Zweck wurde von *Grandis* und *Mainani*[1]) eingeführt. Das von ihnen gebrauchte Reagens war Purpurin oder 1.2.4-Trihydroxyanthrachinon:

```
        CO   OH
                 \ OH

        CO   OH
```

Eine in 95 %igem Alkohol gesättigte Lösung dieser Substanz gibt mit Calciumsalzen, und zwar besonders mit Calciumchlorid einen in Alkohol und in Wasser unlöslichen Niederschlag. Die Lösung zeigt keine Neigung, andere Gewebsteile zu färben, als diejenigen, die Calcium enthalten, vorausgesetzt, daß man sie nicht zu lange einwirken läßt.

Die oben genannten Forscher bedienten sich zum Nachweis des Calciums in Geweben mittelst des erwähnten Chinon-Reagenzes folgender Methode: Das Gewebe kann dabei im frischen oder gehärteten Zustande untersucht werden. Im ersten Falle werden mit Hilfe der Gefriermethode Schnitte des Gewebes bereitet. Im andern Falle werden die in Alkohol gehärteten Gewebe mittelst der Einbettmethode zerlegt. Die so erhaltenen Schnitte werden in eine gesättigte alkoholische Purpurinlösung gelegt und darin belassen, bis sie stark rot gefärbt sind, was für gewöhnlich nach 5—10 Minuten der Fall ist. Die tiefe Färbung ist nicht gleichmäßig. Sie ist auf die verkalkten Teile beschränkt. Die Schnitte werden nun in eine 0·75 %ige Natriumchloridlösung gebracht. Hier findet eine doppelte Umsetzung zwischen dem Calciumsalz und dem Chlorid statt, wobei in sehr geringer Menge Calciumchlorid, Natriumphosphat und Karbonat entstehen. Da, wo sich die Spuren Calciumchlorid bilden, wird Purpurin gefällt.

Es ist übrigens nicht unbedingt nötig, die Schnitte mit Natriumchlorid zu behandeln, denn in den fraglichen Geweben ist genug Calciumchlorid vorhanden, um die Purpurinfällung zu ermöglichen. Die Anwendung der Natriumchloridlösung bietet jedoch den Vorteil, die Färbung deutlicher und schärfer erscheinen zu lassen. Wenige Minuten der Einwirkung genügen bereits, um diese Wirkung hervorzurufen. Hierauf werden die Schnitte in 70 %igen Alkohol gelegt und der letztere wird so oft erneuert bis er kein gefärbtes Produkt mehr extrahiert. Dann wird mit absolutem Alkohol entwässert und in Balsam eingebettet.

Die eben beschriebene Probe kann in gewissen Fällen zweifellos gute Dienste leisten, nämlich falls das Calcium in einem Schnitte sehr reichlich vorhanden ist, wie z. B. in einem verkalkten Fötusknochen. Sie ist aber bei weitem nicht empfindlich genug, um das Calcium in dem Zellprotoplasma anderer Gewebe nachzuweisen, denn das Purpurin wird bereits

[1]) *Grandis* und *Mainani*, Sur une réaction colorée, qui permet de révéler les sels de calcium déposés dans les tissus organiques. Archiv. ital. de Biolog. 34. 73 (1900).

nicht mehr gefällt, wenn das Calcium im Verhältnis von 1 Teil zu 800 Teilen Wasser zugegen ist. Außerdem, je mehr sich die Verdünnung der Lösung dieser Konzentrationsgrenze nähert, je langsamer geht die Reaktion vor sich.

Es ist hier auch zu bemerken, daß das Natriumchlorid nur mit einem sehr winzigen, ja vielleicht fast unendlich kleinen Teil des als Karbonat und Phosphat vorhandenen Calciums reagiert, und daß folglich die Menge des nach eben 10 Minuten gebildeten und vorhandenen Calciumchlorides niedriger ist als diejenige, welche die Löslichkeit des Purpurins beeinträchtigen könnte. Dieser Umstand vermindert folglich den Wert des Reagenzes sehr beträchtlich für allgemeine Zwecke.

Von *Grandis* und *Mainani* wurde ferner Pyrogallol als Calciumreagens empfohlen. Da es die Eigenschaften einer schwachen Säure besitzt, wirkt es auf das Calcium in den kalkhaltigen Ablagerungen und bildet Calciumpyrogallat. Dieses Salz ist ziemlich unlöslich, während die entsprechenden Natrium- und Calciumsalze löslich sind. Nach dem Pyrogallolverfahren werden die Gewebsschnitte mit einer Pyrogallollösung behandelt. Das gebildete Calciumpyrogallat wird dabei, indem es Sauerstoff aus der Luft absorbiert, intensiv braun, so daß sich auf diese Weise die Verteilung des Calciums in dem Schnitte bemerkbar macht. Die Schnitte müssen nun sehr rasch mit Wasser gewaschen, ebenso schnell entwässert und in Balsam eingebettet werden. Da Natrium-, Kalium- und Magnesiumpyrogallat nur schwierig extrahierbar sind, so nehmen auch oft die Gewebe, die nicht stark mit Calcium imprägniert sind, eine leichte braune Färbung an. Aus diesem Grunde kann nach eben beschriebener Methode das Vorkommen der Calciumsalze nur da sicher nachgewiesen werden, wo die braune Färbung sehr ausgesprochen auftritt, und in Wirklichkeit könnte man, um sicher zu gehen, nur da das Auftreten von Calciumsalzen annehmen, wo man sie auch unter Nichtberücksichtigung der Farbreaktion bereits, nach dem Charakter der Gewebe zu schließen, zu erwarten hat.

v. Kossa[1]) führte folgende Modifikation der Pyrogallolreaktion ein: 1 *g* Pyrogallussäure wird in 40 cm^3 Wasser gelöst; zu der Lösung fügt man 0·5 *g* festes Natriumhydrat, worauf die Lösung braun wird. Die Schnitte werden fünf Minuten in dieser Flüssigkeit belassen, dann herausgezogen und vollständig mit destilliertem Wasser gewaschen, um die gefärbte Flüssigkeit zu entfernen. Die intensiv braun gefärbten Calciumfällungen werden bei mehrtägigem Aufbewahren im Wasser bräunlich-schwarz.

v. Kossa führte auch noch eine andere und indirekte Methode für den Nachweis des Calciums in pathologischen Geweben ein. Nach diesem Verfahren werden die Gewebsschnitte fünf Minuten lang in einer 5%igen

---

[1]) *v. Kossa,* Über die im Organismus künstlich erzeugten Verkalkungen. *Zieglers* Beiträge. **29**. 163 (1901).

Silbernitratlösung belassen, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und in der gewöhnlichen Weise fixiert. Überall, wo in derartigen Präparaten kalkhaltige Ablagerungen vorkommen, tritt eine gelbe Färbung auf, die auf Bildung von unlöslichem Silberphosphat beruht, das aus der Phosphorsäure, mit welcher das Calcium in solchen Depots verbunden ist, und dem Silber entsteht. Im Lichte geht die gelbe Färbung wegen der sich abspielenden Reduktion des Silbersalzes bald ins Graue und schließlich ins Tiefschwarze über. Der Reduktionsvorgang wird nach *v. Kossa* durch die Anwesenheit gewisser organischer Verbindungen in den geringen Ablagerungsmengen erklärt. Bei dieser Reduktion spielt übrigens auch die Luft eine Rolle, denn unter Luftabschluß findet dieser Prozeß nicht oder höchstens nur in sehr geringfügigem Maße statt. Jedenfalls kann nach diesem Silbernitratverfahren kalkhaltige Substanz überall, wo sie vorkommt, auch bemerkt werden, sei es durch die Färbung oder die reduzierte Silberverbindung, die sich auf ihr oder in ihr bildet.

Schmorl[1]), *Klotz*[2]) und andere haben die Anwendung dieser Reaktion weiter verfolgt. Nach dem zuletzt genannten Forscher werden die Schnitte 3—12 Stunden lang im Reagens belassen, worauf sie mit Wasser gewaschen und in Balsam eingebettet werden. Er zeigte, daß in solchen Schnitten auch die Kohlensäure mit dem Silber reagiert, wenn auch langsamer, und daß infolgedessen die Calciumkarbonatkörnchen in den Ablagerungen mit Silberkarbonat bedeckt werden, das im Sonnenlicht Kohlendioxyd abgibt und dabei „reduziertes" (schwarzes) Silberoxyd zurückläßt.

Bei diesem Verfahren werden sehr kleine, in gewöhnlichen Zellen vorhandene Mengen Calcium nicht nachgewiesen, und außerdem findet dabei auch mit Chloriden, Phosphaten, Sulfaten und Karbonaten anderer Basen, die in den kalkhaltigen Ablagerungen vorhanden sein können, auf Grund von Absorption Reaktion statt. In kalkhaltigen Depots kommen außer Kalkseifen auch Seifen anderer Basen vor. Die Fettsäuren dieser Seifen vereinigen sich nun mit dem Silber des Reagenzes unter Bildung einer „reduzierbaren" Silberverbindung. — Aus alledem geht hervor, daß die von *v. Kossa* eingeführte Methode bei Untersuchung kalkiger Degeneration zweifellos Nutzen gewährt, daß sie aber mit manchem Mangel behaftet ist, der zu Irrtümern führen kann, und daß daher bei ihrer Anwendung jeder besondere Fall eine sorgfältige Berücksichtigung der etwaigen Fehlerquellen erfordert.

Um die Verteilung des Calciums in Zellen und Geweben bei anderen Fällen als bei Verkalkungen oder bei kalkiger Degeneration nachzuweisen, wurde von *A. B. Macallum* eine besondere Methode angewandt, bei der die Gegenwart dieses Elementes indirekt bestimmt wird. Sie ist eine Modifi-

---

[1]) *Schmorl*, Pathologisch-anatomische Untersuchungsmethode. 2. Auflage. Leipzig 1901.

[2]) *O. Klotz*, Studies upon calcareous degeneration. Journ. of Experim. Medic. 7, 633 (1905).

kation des für den Nachweis der Lokalisation der Schwefelsäure, die als Sulfat in der Niere vorhanden ist, weiter unten beschriebenen Verfahrens. Die dabei zu gebrauchenden Reagenzien sind: 1. schwefelsäurehaltiger Alkohol, der aus 2 Vol. Schwefelsäure (spez. Gew. 1·84) und 100 Vol. absoluten Alkohols besteht; 2. eine Bleiacetatlösung in $\frac{n}{10}$-Verdünnung; 3. eine Lösung von Glyzerin-Ammoniumsulfid, die durch Verdünnung von reinem Glyzerin mit einem äquivalenten Volumen sauren Ammoniumsulfids bereitet ist.

Die Ausführung des Verfahrens gestaltet sich, wie folgt: Wenn es sich um einzellige Gefüge handelt, werden sie noch ganz frisch in den Säurealkohol gebracht und 20 Minuten darin belassen, hierauf wird etwa 5—6mal sorgfältig mit absolutem Alkohol gewaschen, um jede Spur freier Säure zu entfernen, dann zur Abtrennung der Organismen zentrifugiert und schließlich für eine halbe Stunde in die Bleiacetatlösung gebracht. Nun wird sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen, um das unveränderte Reagens vollständig zu beseitigen, wozu man wieder die Zentrifuge benutzt. Dann bringt man wieder eine kleine Menge des Sediments auf einen Objektträger, fügt einen Tropfen Glyzerinsulfid hinzu und bedeckt mit einem Deckgläschen. Wenn ein anderes Gewebe auf seinen Calciumgehalt zu untersuchen ist, werden die Schnitte nach der beim Nachweis der Verteilung des Kaliums beschriebenen Methode dargestellt. Man läßt die Schnitte gefrieren und bringt sie flach in den schwefelsäurehaltigen Alkohol, wo sie 20 Minuten lang verbleiben. Dann werden sie sorgfältig mit absolutem Alkohol gewaschen, um die freie Säure vollständig zu entfernen und nun 30 Minuten in die Bleiacetatlösung gelegt. Nachdem sie dann mit destilliertem Wasser so lange gewaschen worden sind, bis keine Spur unangegriffenen Bleiacetats mehr vorhanden ist, werden sie auf Objektträger in das Glyzerinsulfidreagens eingelegt.

Sowohl in diesen Schnitten, als auch in den Präparaten der einzelligen Organismen wird die ursprüngliche Verteilung des Calciums durch das Auftreten des Bleisulfidniederschlags nachgewiesen. Der säurehaltige Alkohol führt das anorganische Calcium in Calciumsulfat über, welches völlig unlöslich in Alkohol ist. Das Calciumsulfat reagiert mit dem Bleiacetat unter Bildung von Bleisulfat, das in Wasser unlöslich, aber farblos ist. Das Bleisulfat gibt dann mit dem Ammoniumsulfid die schwarze Bleisulfidreaktion.

Bei diesem Verfahren liegt vielleicht eine Fehlerquelle darin, daß der schwefelsäurehaltige Alkohol die Phosphorsäure aus den Phosphaten nicht extrahiert. Die letzteren können sich nämlich mit dem Blei unter Bildung von Bleiphosphat verbinden, das sich in Wasser noch weniger löst als Bleisulfat. Um diesen möglichen Fehler zu vermeiden, sollte man nach der Behandlung mit Bleiacetat 2 oder 3 Minuten lang mit $\frac{n}{10}$-Salpetersäure waschen, wodurch das Bleiphosphat rasch extrahiert, das vorhandene Blei-

sulfat aber nicht beeinträchtigt wird. Nachdem die Schnitte zur Beseitigung der Säure gewaschen sind, werden sie auf einen Objektträger gebracht, mit der Glyzerinsulfidmischung behandelt und mit einem Deckgläschen zugedeckt.

Die beschriebene Reaktion ist nicht so empfindlich, wie sie es theoretisch sein sollte und die Methode schließt manche Fehlermöglichkeit ein. Als erste ist der Diffusion zu gedenken, die vor sich geht, wenn die Schnitte zunächst in den säurehaltigen Alkohol gelegt werden und ferner, wenn sie aus dem Alkohol in die Bleiacetatlösung kommen. Dabei kann eine gewisse Wiederverteilung der Calciumsalze stattfinden. Eine der anderen Fehlerquellen könnte auf der Reaktion zwischen dem Calciumsulfat und dem Bleiacetat beruhen, falls dasselbe nicht an der Stelle, wo das erstere wirklich lokalisiert ist, aufzutreten vermag. Andrerseits löst sich aber Calciumsulfat nur in einem Maße von weniger als 1 Teil in 2.000.000 absoluten Alkohols, während sich Bleisulfat nur im Verhältnis von 46 Teilen zu 1.000.000 Teilen Wasser löst.[1]) Auf Grund dieser Tatsache ist demnach keine Fehlermöglichkeit anzunehmen.

Nach *A. B. Macallum* leistet die eben erörterte Methode zum Nachweis anorganischer Calziumverbindungen in Geweben ausgezeichnete Dienste. Sie wird sich zweifellos auch anderen bei der Bestimmung der Verteilung des Calciums in Zellen und Geweben nützlich erweisen. Man muß aber bei ihrem Gebrauch immer darauf bedacht sein, daß sie Fehlermöglichkeiten in sich einschließt.

D. Kupfer.

Das Auftreten von Kupfer als Bestandteil von Zellen und Geweben ist heute für gewisse Avertebraten und Vertebraten sicher erwiesen. Kupfer findet sich im Blut von Crustaceen und im Blut und Organen von Mollusken, besonders von Cephalopoden. Bei Vertebraten kommt es im Pigment gewisser Flügel- und Schwanzfedern des Turako (Turacus[2]) vor. Im Pflanzenreich wurde es bisher nur in sehr beschränktem Maße nachgewiesen. Es ist gelegentlich nur in der Asche einiger Pflanzen, z. B. in den die Hauptnahrung des Turako (Pisangfresser) bildenden Bananen und im Pisang aufgefunden worden. *Halliburton*[3]) fand ferner auch in der Asche der Nucleoproteide der Leber außerordentlich geringe Mengen Kupfer. *Sloutzoff*[4])

---

[1]) Berechnet aus der elektrischen Leitfähigkeit von $PbSO^4$ durch *Kohlrausch* und *Rose*. Zeitschr. f. physikal. Chemie. **12**. 241 (1893); loc. cit.

[2]) *A. H. Church*, Researches on Turacin, an animal pigment containing copper. Trans. Roy. Soc. 159. 627 (1869); vgl. auch Researches on Turacin etc. Proc. Roy. Soc. **51**. 399 (1892).

[3]) *W. D. Halliburton*, The proteids of kidney and liver cells. Journal of Physiol. **13**. 806 (1892).

[4]) *B. Sloutzoff*, Über die Bindung des Kupfers durch die Leber. *Hofmeisters* Beiträge. 2. 307 (1902).

konnte Kupfer bei Kaninchen, die vier Tage lang täglich mit je 0·200 *g* Kupfersulfat gefüttert worden waren, in Leber. und zwar häufig in Verbindung mit ihren Nucleinen nachweisen. Es trat hier aber nicht in fest gebundener Form auf, denn die Verbindung wurde leicht von 0·3%iger Salzsäurelösung angegriffen und durch Pepsin und Salzsäure unschwer zerlegt.

Das Auftreten von organischen oder „maskierten" Kupferverbindungen ist für das Turacin, das Pigment des bereits erwähnten Turako, ferner auf Grund entsprechender Reaktionen für die kupferhaltige Verbindung Hämocyanin aus dem Blute der Mollusken und Crustaceen erwiesen. In Hämocyanin ist nach *Henze*[1]) das Kupfer so fest gebunden, daß es erst nach Behandlung mit verdünnter Salzsäure oder Essigsäure die charakteristische Kupferreaktion mit Ferrocyankalium, und dann auch nur nach und nach, zu liefern vermag.

Wenn demnach also auch „maskierte" Kupferverbindungen vorkommen, so sind bisher jedoch nur mikrochemische Reaktionen zum Nachweis von anorganischem Kupfer ausgearbeitet worden. Mit Ausnahme des Turacins bietet aber keine „maskierte" Verbindung bei der Demonstrierung irgend welche besondere Schwierigkeiten, denn das Freimachen des Kupfers wird leicht sowohl mit Ammoniumsulfid bewerkstelligt als auch mit einer Mischung von gleichen Volumina 0·5%iger Salzsäure und 1·5%iger Ferrocyankaliumlösung. Die Säure setzt das Kupfer in Freiheit und das Ferrocyanid schlägt es da nieder, wo es freigemacht wurde.

Zum Nachweis der anorganischen Kupferverbindungen bedient man sich der von *Boyce* und *Herdman*[2]) eingeführten Reaktionen. Nach ihnen werden die Gewebe (Gewebe der Auster) in absolutem Alkohol gehärtet und in Paraffin eingebettet oder schnell durch destilliertes Wasser gezogen und in eine neutrale, frisch dargestellte Lösung von Gummi arabic. gebracht, um sie dann mit dem Gefriermikrotom zu schneiden. Die so bereiteten Schnitte werden nun nach einer der folgenden drei Methoden behandelt. Nach der einen Methode werden sie in eine 1·5%ige Lösung von Ferrocyankalium gebracht, die eine deutliche braunrote Ferrocyankupferreaktion gibt. Zusatz von einem gleichen Volumen 0·5%iger Salzsäurelösung zu dem Ferrocyanidreagens beschleunigt den Reaktionsvorgang, der sich in einigen Fällen überhaupt erst nach Zufügen der Salzsäure abspielt. Die Schnitte werden dann mit destilliertem Wasser gewaschen, mit absolutem Alkohol entwässert, in Zedernöl geklärt und in Balsam eingebettet. In derartigen Präparaten kann man unter dem Mikroskop die Verteilung des Kupfers da, wo es reichlich vorhanden ist, durch die Anwesenheit von rotbraunen Körnchen und dort, wo es nur in außerordentlich geringen Mengen auftritt, durch eine schwache, gelbrote Farbe nachweisen.

---

[1]) *M. Henze,* Zur Kenntnis des Hämocyanins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **33**. 370. — Derselbe, Über den Kupfergehalt der Cephalopodenleber. 417 (1901).

[2]) *Boyce* and *Herdman,* On a green leucocytosis in oysters associated with the presence of copper in oysters. Proc. Roy. Soc. **62**. 30 (1898).

Die zweite Methode besteht darin, daß man zu den aus dem Alkohol entnommenen Schnitten etwas saures Ammoniumsulfid fügt, das in den Schnitten mit dem kupferhaltigen Material ein dunkles Gelbbraun liefert.

Bei der dritten Methode werden die Schnitte in eine verdünnte Hämatoxylinlösung, die auf einem Uhrglas durch Zusatz weniger Kristalle zu etwas Wasser dargestellt wird, gebracht, wo sie bald eine deutlich dunkelblaue Färbung hervorrufen, die sich lediglich auf diejenigen Gefüge beschränkt, in denen die Kupferverbindung oder -Verbindungen vorkommen. Die Schnitte werden dann mit Wasser gewaschen, entwässert und in Balsam eingebettet. Unter dem Mikroskop werden die kupferhaltigen Gewebsteilchen als dunkelblaues Produkt nachgewiesen. Die Verteilung dieser Färbung in den Präparaten ist dieselbe, wie die bei der Reaktion mit dem Ferrocyanidreagens.

Da das Kupfer auf das Hämatoxylin in derselben Weise einwirkt, wie es die anorganischen Eisenverbindungen tun, so scheint hierin bei dieser Reaktion eine Verwechslungsmöglichkeit in betreff des Eisens und Kupfers gegeben zu sein. Man kann aber die Resultate der Hämatoxylinreaktion leicht durch den Gebrauch des Säureferrocyanidreagenzes, mit dem das Eisen eine Berlinerblaufärbung, das Kupfer dagegen eine rotbraune Farbe liefert, nachkontrollieren.

A. B. Macallum hat selbst die Methode von *Boyce* und *Herdman* gebraucht, und er hat auch den Vorzug gehabt, die Präparate dieser Forscher prüfen zu können. Nach seinen Erfahrungen kann er, also auf direkten Kenntnissen fußend, die Ferrocyanid- und die Hämatoxylinmethode empfehlen. Beide sind nach ihm sehr empfindliche und leicht ausführbare mikrochemische Reaktionen auf Kupfer.

E. Chlor.

Chlor kann sowohl in „maskierter" oder Halidverbindung als auch in Haloidform auftreten, in der es leicht nachweisbar ist. In maskierter Form kommt es gewöhnlich als Alkyl- oder Arylchlorid vor. Als Beispiele der ersteren sind Trichloressigsäure, Chlormethan und Chloroform zu nennen. Das Chlor dieser Verbindungen reagiert nicht direkt mit Silbernitrat unter Bildung von Chlorsilber und das Chlor wird aus diesen Verbindungen auch nur durch Erhitzen mit einer Lösung von kaustischem Alkali in Freiheit gesetzt, das sich mit ihm zu Chlorid verbindet. Es gibt bekanntlich noch andere organische Verbindungen wie die Chloramine, z. B. Methylchloramin, in denen das Chlor mit dem Stickstoff direkt verbunden ist. In der Regel sind aber diese Bindungen so lose, daß das Chlor aus ihnen leicht freigemacht werden kann.

Über das Vorkommen von derartigen maskierten Chlorverbindungen in tierischen und pflanzlichen Zellen liegt bis jetzt noch nicht viel direktes Beweismaterial vor. Bis heute ist nur eine Verbindung[1]) aus tierischen Or-

[1]) *E. Roos* (Zur Kenntnis des Jodothyrins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 25. 1. 1898) fand in der Schilddrüse Spuren einer dem Jodothyrin analogen Chlorverbindung.

ganen isoliert worden, in der, nach schwachen Anzeigen zu schließen, solch gebundenes Chlor vorhanden ist. Die Tatsache aber, daß Jod mit Spongin oder mit dem Protein der Schilddrüse eine „maskierte" Verbindung bildet, läßt annehmen, daß auch analoge Chlorverbindungen in Zellen und Geweben auftreten können. Infolgedessen sollten die mikrochemischen Methoden zum Nachweis der Lokalisation des Chlors in Zellen sowohl der Demonstrierung von Halid- als auch von Haloidchlor angepaßt werden.

Es ist wahrscheinlich, daß die Halidverbindungen, wenn sie in Zellen vorkommen, immer nur in außerordentlich geringer Menge auftreten; daher erscheint auch das Problem ihrer Demonstrierung bis jetzt wenigstens nur als ein untergeordnetes.

Der Nachweis des Haloidchlors bietet keine Schwierigkeit, denn die dabei zu verwendende Reaktion ist eine der empfindlichsten und sich am raschesten abspielenden, die wir auf dem Gebiete der biologischen Mikrochemie kennen. Das gebrauchte Reagens, Silbernitrat, bildet mit dem Haloidchlor den äußerst schwerlöslichen Niederschlag von Silberchlorid. Dieses Reagens ist, der Geschichte nach, seit dem Jahre 1854 im Gebrauch[1], und zwar hauptsächlich, um die Umrisse der Zellen und Interzellularräume mittelst einer Ablagerung von „reduziertem" Silber zu kennzeichnen, das sich entwickelt, wenn die mit Silbernitrat behandelten Präparate dem Lichte ausgesetzt werden. Das erhaltene Resultat wurde gewöhnlich auf Bildung einer unlöslichen Verbindung aus Silber und einem Eiweißkörper, „Albuminat", in der interzellularen Zementsubstanz und den Grenzstrukturen der Interzellularräume zurückgeführt. Einige Forscher wiesen allerdings auch die Annahme nicht von der Hand, daß in der betreffenden Ablagerung Silberchlorid auftrete, aber erst *Schweigger-Seidel* führte den Niederschlag vollständig auf Chlorsilber zurück.[2] Man glaubte zunächst die Tatsache, daß Albumine und Gelatine, in gewöhnlicher Weise dargestellt, mit Silbernitrat einen im Sonnenlicht reduzierbaren Niederschlag liefern, als Rechtfertigung der Annahme vorbringen zu können, daß die in den Geweben beobachtete „reduzierte" Verbindung ein Albuminat sei. Im Jahre 1905 konnte nun *A. B. Macallum*[3] nachweisen, daß Gelatine oder die Eiweißkörper des Eiereiweißes, sorgsam gereinigt und von jeder Spur Chlorid befreit — durch Lösen in Wasser, Fällen aus diesen Lösungen durch Sättigen mit Ammoniumsulfat und durch mehrmalige Wiederholung dieser Operationen —, nach Zusatz einer Silbernitratlösung in verdünnter Salpetersäure selbst im hellen Sonnenlichte keine Reduktion verursachen. Dies

---

[1]) Zur Geschichte der Anwendung dieses Reagenzes vgl. *Macallum*, On the nature of the silver reaction in animal and vegetable tissues. Proc. Roy. Soc. Vol. **76**. 217 (1905); Die Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung. Ergebnisse der Physiologie. **7**. 552 (1908).

[2]) Verhandlungen der Königl. Sächsisch. Gesellsch. d. Wissenschaft. Math.-Physikal. Klasse. **20**. 305 (1868).

[3]) *A. B. Macallum,* On the nature of the silver reaction in animal and vegetable tissues. Proceedings Roy. Soc. Vol. **76**. 217 (1905).

findet seine Erklärung darin, daß durch die Fällung mit Ammoniumsulfat alle Chloride entfernt werden, und daß durch die vorhandene Salpetersäure die Bildung von Phosphatniederschlägen oder einem anderen Silbersalz oder endlich von einer solchen Verbindung des Silbers mit den Eiweißkörpern oder ihren wesentlichen Konstituenten, die durch das Sonnenlicht angegriffen werden, verhindert wird. *Macallum* zeigte ferner auch, daß das Silber in Form des Karbonats, Sulfats, Formats, Oxalats, Acetats, Laktats, Tartrats, Citrats, Succinats, Valerats, Oleats, Stearats, Palmitats, Glyzerinphosphats und endlich als Aminosäuresalze von dem Sonnenlicht in Gegenwart von Salpetersäure nicht angegriffen wird. Das gleiche Resultat ergaben auch die Purine, Lecithine, Harnstoff, Leucin, Tyrosin, Indol, Skatol und Derivate. Andrerseits reduzieren aber Sulfocyanürwasserstoffsäure, Taurin und Kreatin, die saure Lösung des Silbersalzes im Sonnenlicht und auch Cyanursäure wirkt ähnlich, aber weniger leicht, während Alloxan und Alloxantin augenscheinlich unmittelbar Reduktion zu metallischem Silber hervorrufen.

Da diese Verbindungen mit Ausnahme des Kreatins in den Geweben nur in verschwindend geringen Mengen vorkommen, so ist es auch einleuchtend, daß sie den Wert des Silbersalzes als Reagens für Chloride nicht beeinflussen können. Kreatin findet sich natürlich in dem gestreiften Muskelgewebe und in der Niere von Vertebraten, es ist aber jedenfalls nicht in den Geweben von Avertebraten vorhanden. Es kann daher auch nur in dem gekennzeichneten Maße bei der Untersuchung auf Verteilung von Chloriden in Geweben zu Irrtümern führen.

Aus alledem geht genügsam hervor, daß das in verdünnter Salpetersäure gelöste Silbernitrat ein Reagens darstellt, das zum Nachweis der Verteilung der Chloride und des Chlors organischer Verbindungen, welches mittelst Salpetersäure leicht in Freiheit gesetzt wird, geeignet ist. Dieses Reagens ist außerordentlich empfindlich. Nach *A. B. Macallum* ist mittelst der Reagenzglasprobe noch 1 Teil Chlor als Chlorid in 1,600.000 Teilen Wasser nachzuweisen. Nach *Kohlrausch* und *Rose*[1]), die sich bei dieser Bestimmung der elektrolytischen Leitfähigkeit bedienten, lösen sich 1·7 Teile Silberchlorid in 1,000.000 Teilen Wasser bei 18° C, d. i. also 1 Teil Chlor als Chlorsilber in 2,380.000 Teilen Wasser. Das Silbersubchlorid, das bei der Einwirkung des Lichtes auf das Chlorid resultiert, ist noch viel schwerer löslich als das letztere. Verfasser konnte unter dem Mikroskop bei einer Bestimmung noch Subchloridteilchen nachweisen, bei der das Chlor des Chlorids sich wie 1 Teil zu 3,000.000 Teilen Lösung verhielt. Die Reaktion wäre in der Tat noch viel empfindlicher, wenn auch wirklich alles erzeugte Silberchlorid durch die Einwirkung des Sonnenlichts in Subchlorid übergeführt würde. *Carey Lea*[2]) hat bereits bestimmt, daß von dem gesamten

[1]) *Kohlrausch* und *Rose*, loc. cit. Zeitschr. f. physikal. Chemie. **12**. 241 (1893).

[2]) Über die Zusammensetzung der aus dem Chlorsilber unter dem Einfluß des Lichtes hervorgehenden Verbindung vgl. *Macallum*, On the nature of the silver reaction in animal and vegetable tissues. Proc. Roy. Soc. B. **76**. 217—223.

Silberchlorid nicht mehr als 1% in Subchlorid übergeführt wird und daß sich dieses letztere mit nicht mehr als 8 Teilen unreduziertem Chlorid vereinigt. Das vorhandene Chlor wird also in Form einer gefärbten Verbindung nachgewiesen, die im besten Falle ein Neuntel des gebildeten gesamten Silberchlorids enthält.

Das bei den fraglichen Untersuchungen anzuwendende Reagens ist eine $\frac{n}{10}$-Silbernitratlösung in destilliertem Wasser, frei von jeder Spur Chlorid und Ammoniak, der 25 *cm*³ 60%iger Salpetersäure, auf den Liter bezogen, zugesetzt sind. Handelt es sich um die Untersuchung von Zellen und Geweben, so wird dieses Reagens immer in vollständig frischem Zustande benutzt. Liegen einzellige Organismen vor, so werden diese für $^1/_2$ Stunde in das Reagens gebracht. Eine Portion der Mischung wird auf einen Objektträger gelegt, eine gleiche Menge von konzentriertem, reinem Glyzerin wird hinzugefügt, ein Deckglas aufgesetzt und das Präparat $^1/_2$ Stunde lang dem hellen Sonnenlicht exponiert. Die Organismen und das Reagens können auf dem Objektträger gemischt werden. Das Präparat wird zugedeckt, damit es vor Staub und Verdunstung geschützt ist. Wenn die Imprägnierung vollständig vor sich gegangen ist, wird es zum „Reduzieren“ für $^1/_2$ Stunde in Sonnenlicht gebracht; während des Reduktionsverlaufes soll sorgfältig irgendwelche Verdunstung vermieden werden. Jetzt wird ein Tropfen konzentrierten Glyzerins zugesetzt, das Ganze sorgsam mit einer Gänsekielspitze umgerührt und dann ein großes Deckglas darüber gelegt.

Die Färbung, die durch den Reduktionsprozeß hervorgerufen wird, variiert beträchtlich. Sie kann violett, rötlich-violett und bei reichlichen Mengen bläulich-violett sein. Sie kann aber auch rötlich-braune oder gelbbraune Abstufungen zeigen, wenn dünne Schichten, Membranen oder Ablagerungen vorhanden sind. Die Farbnuancen sind zweifellos davon abhängig, ob die „reduzierte“ Silberverbindung in sehr feiner oder in anderer Form vorhanden ist.

Handelt es sich um die Untersuchung von Geweben, so kann man, wie folgt, verfahren: Stückchen der Gewebe werden im Reagens, und zwar am besten auf dem Objektträgerglas zerzupft. Zu diesem Zwecke muß man sich wieder einer Gänsekielspitze oder Glasnadel bedienen. Das Präparat wird dann mit einer genügenden Menge Reagens für $^1/_2$ Stunde beiseite gestellt, nachdem es vorher zum Schutze vor Staub und Vertrocknung mit einem Glas bedeckt worden ist. Dann wird ein Tropfen Glyzerin zugesetzt und wieder zugedeckt. Die besten Präparate werden unter Anwendung von gefrorenen Schnitten frischen Gewebes erhalten, die man nach dem zum Nachweis des Kaliums beschriebenen Schnittverfahren darstellt. Die Schnitte werden dabei gefroren und flach in das Reagens gelegt, wo man sie eine halbe Stunde liegen läßt, dann werden sie auf einen Glasobjektträger gebracht und in Glyzerin eingebettet. Bei derartigen Präparaten kann man das Vorkommen der Chloride nicht nur in den Zellen

drinnen, sondern auch auf ihrer Außenseite demonstrieren. Dieser Umstand ist von hoher Bedeutung; setzt er uns doch in den Stand, Beziehungen der Zellen zu den Chloriden ihrer Umgebung zu erkennen.

Am besten sind die Präparate, wenn das Reagens schnell eingedrungen ist, und wenn sie wenigstens ½ Stunde lang dem vollen Sonnenlichte ausgesetzt worden sind. Bei Glyzerinpräparaten kann die Farbe bei Fernhalten des Lichtes bleiben; bei Gegenwart von Sonnenlicht kommt aber die Färbung bald wieder zum Vorschein. Bei der Darstellung der Präparate soll man sorgfältig darauf achten, daß das Reagens mit den einzelnen Zellen der Gewebe so bald wie irgend möglich in Berührung kommt und auch die inneren Teile einer jeden Zelle erreichen kann. In Gefrierpräparaten werden viele der Zellen radial geschnitten und auf diese Weise wird das Reagens in Berührung mit den Außenseiten der Zellen gebracht. Aus diesem Grunde sind häufig die gefrorenen Schnittpräparate außerordentlich wertvoll. Durch augenblickliche Niederschlagsbildung weisen sie die Verteilung der Chloride im Zytoplasma nach. Solche Präparate enthalten in der Regel in reichlicher Menge zerteilte Kerne, die das sofortige Eindringen des Reagenzes in den Kerninhalt ermöglichen.

Manchmal verursacht die Gegenwart von für das Reagens undurchlässigen Hüllen (Scheiden) eine Verzögerung im Reaktionsverlauf. Dies ist besonders der Fall bei Marknervenfasern, die mit einem Neurilemm versehen sind, bei denen das Reagens hauptsächlich nur durch die *Ranvier*schen Knoten zu der Achse gelangen kann. Infolgedessen erhält man dann in den Achsen auf der Seite eines jeden Knotens eine Streifung — von den Histologen als *Frommann*sche Linien bezeichnet. Sie sind auf Veränderung der metastabilen und labilen Bedingungen der Silberchloridlösung zurückzuführen. Bei dem metastabilen Stadium findet die Entwicklung der Übersättigung bis zum höchsten Grade statt; im labilen Zustande geht Diffusion durch die Achse vor sich, wobei eine Zwischenzone (zwischen den Streifen) entsteht. Wenn der entscheidende Konzentrationspunkt der vordringenden Lösung erreicht ist, beginnt die Fällung. Sie hält an, bis die Lösung zu dem metastabilen Zustand zurückgekehrt ist. Auf diese Weise wird ein Streifen gebildet. Dieser Prozeß wiederholt sich häufig so lange, als Diffusion stattfindet. Da aber die Silbersalzlösung immer mehr und mehr verdünnt wird, so wird dann auch der kritische Konzentrationspunkt langsamer erreicht und auf diese Weise werden die zuletzt gebildeten Streifen voneinander durch breiter und breiter werdende Zwischenstreifungen getrennt.[1])

Die erwähnten Erscheinungen werden auch bei anderen Strukturarten als bei Nervenfasen beobachtet. Wenn ein Stückchen eines Gewebes, z. B. von der Leber, der Magenschleimhaut oder Muskel eine Woche lang

---

[1]) Vollständige Erklärung dieses betreffenden Phänomens vgl. bei *A. B. Macallum* and *T. L. Menten*, On the distribution of chlorides in nerve cells and fibres. Proc. Roy. Soc. Vol. 77. 181—185 (1906).

in dem Reagens gelegen hat, so wird man dann bei der mikroskopischen Untersuchung ebenfalls Streifungen obiger Art nachweisen können. Man kann so in den Gangliennervenzellen Streifungen erhalten, die ganz so wie die der Achsen gezeichnet sind. In derartigen Gewebsstückchen dringt das Reagens nur langsam ein. Es findet Diffusion der Chloride in die Nervenzellen statt und Zonen, die metastabile und labile Zustände der Silberchloridlösung anzeigen, werden gebildet.

F. Jod.

Das Jod als Jodid findet sich in tierischen oder pflanzlichen Geweben nur in außerordentlich geringer Menge vor; daher ist bis jetzt auch noch keine Reaktion zu seiner Demonstrierung entwickelt worden. Als organische Verbindung kommt es dagegen im tierischen und pflanzlichen Organismus in solchen Mengen vor[1]), daß seine Gegenwart makrochemisch nachgewiesen werden kann. Über seine Bindung kann man bis heute, nur einige einzelne Fälle ausgenommen, noch nichts aussagen. In der Skelettkoralle von Gorgonia Cavolinii kommt es als Dijodtyrosin[2]) vor. In den Hydrolysenprodukten des Jodspongins ist Tyrosin aber nicht gefunden worden. Nach der von *Harnack*[3]) bestimmten, fest gebundenen Jodmenge (8·20%) kann man schließen, daß es mit jeder der im Molekül vorhandenen Aminosäuren, und möglicherweise in ihren Alkylgruppen, verbunden ist. In dem Jodothyrin von *Baumann* kommt das Jod in sehr verschiedenen Mengen vor. In einigen dieser Präparate finden sich mehr als 90% dieses Halogens. Es ist darin so fest gebunden, daß es nur durch Schmelzen und Veraschen mit Natriumhydrat und Natriumnitrat oder durch längeres Kochen mit konzentrierter Salzsäure in Freiheit gesetzt werden kann.[4])

Diese Beobachtungen machen es sehr wahrscheinlich, daß das Jod in organischen Verbindungen lebender Materie so fest gebunden ist, wie das Chlor in der Trichloressigsäure oder im Chloroform. Es muß also jedenfalls jede für den Nachweis des Jods in jodhaltigen Verbindungen der Tier- oder Pflanzenzellen anzuwendende Methode auf die Schwierigkeiten,

---

[1]) *Golenkin* (Bull. Soc. d'Hist. naturelle de Moscou. 1894. p. 297) fand in Seealgen, in Bonnemaisonia asparagoides, freies Jod in den Vakuolen von eigentümlichen, kleinen Zellen, welche die sprießenden Keime und die Zystocarpen dieser Form bedecken. Dies läßt darauf schließen, daß das Jod in den Zellen der Alge als ein Jodid auftritt, das aus dem Seewasser absorbiert wird. Es ist auch noch zu bemerken, daß freies Jod in den Sekreten gewisser Coleopteraarten zu finden ist. (Vgl. von *Fürth*, Vergleich.-chem. Physiol. 1903. 364.)

[2]) *Wheeler* and *Jamieson*, Synthesis of jodgorgoic acid. Am. Chem. Journ. **33.** 365 (1905). — *M. Henze*, Zur Chemie des Gorgonins und der Jodgorgosäure. Zeitschrift f. physiol. Chem. **38.** 60 (1903). — Derselbe, Zur Kenntnis der jodbindenden Gruppe der natürlich vorkommenden Jodeiweißkörper. **51.** 64 (1907).

[3]) *Erich Harnack*, Über das Jodospongin, die jodhaltige eiweißartige Substanz aus dem Badeschwamm. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24.** 412 (1898).

[4]) *F. Baumann*, Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper. 1. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **21.** 319 (1896).

die derartige Bindungsarten bieten, bedacht sein. Nach *Justus*[1]) kommen solche Jodverbindungen übrigens viel häufiger und in viel größeren Mengen in den Körperorganen vor, als vermutet wurde. Es ist demnach zweifellos von Interesse, zu ermitteln, auf welche Weise sie in den Geweben mikrochemisch bestimmt werden können. Mit dieser Aufgabe hat sich bereits *Justus*[2]) beschäftigt. Er wandte dabei folgende Methode an: Die zu prüfenden Organe werden zunächst in Alkohol gehärtet und dann in Celloidin eingebettet; darauf werden Schnitte von der Dicke einiger Mikromillimeter gemacht, die man schließlich sorgfältig zur Beseitigung aller Alkoholspuren mit Wasser wäscht. Nun werden die Schnitte 1—2 Minuten lang in frisch bereitetem, grün gefärbtem Chlorwasser in einem geschlossenen Gefäß belassen; dann mittelst Platin- oder Glasnadeln in eine verdünnte Silbernitratlösung gebracht, die 1 cm^3 einer 1%igen Silbernitratlösung in 500 cm^3 Wasser enthält, und 2—3 Stunden darin liegen gelassen, wobei sie eine gelbgrüne Farbe annehmen. Es bildet sich dabei ein flockiger, weißer Niederschlag von Chlorsilber auf den Schnitten, die deshalb vor dem Sonnenlicht geschützt werden müssen. Die Schnitte werden nun mit Wasser gewaschen und für 2—3 Stunden in eine warme gesättigte Lösung von Natriumchlorid gelegt, in der bekanntlich das Chlorsilber, aber nicht das Jodsilber, löslich ist. Es wird jetzt also das Silberchlorid extrahiert, wonach auf den Schnitten eine durch das zurückbleibende Jodsilber verursachte Färbung, die zwischen Hellgelb und Kanariengelb variiert, bemerkbar ist. Man wäscht nun sorgfältig mit destilliertem Wasser, um das vorhandene Kochsalz vollständig zu entfernen und führt dann die Präparate in eine 4—5%ige Quecksilberchloridlösung (Mercurichlorid) über, in der sich in wenigen Sekunden, indem das Jodsilber, AgJ, in rotes Mercurijodid, HgJ_2, umgesetzt wird, die gelbe Färbung über Gelbrot und Rosa in Zinnoberrot verwandelt.

Da das Chlor des oben benutzten Chlorwassers ein aktiveres Element darstellt als das Jod, so wird infolgedessen das letztere aus seiner Stellung vertrieben und in Freiheit gesetzt. Vermutlich bildet das Jod mit einem Kation in den Geweben oder in dem Chlorwasser ein Jodid. Wenn die Silbernitratlösung, die zum Fixieren dieses Jods benutzt wird, sehr verdünnt ist, wird sie fast ausschließlich das Jod niederschlagen, während nur eine geringfügige Menge des Silbers zur Bildung von Chlorsilber verbraucht wird. Dies steht mit der allgemeinen Regel im Einklang, daß Silbernitrat aus einer Mischung von gelösten Haloiden die Salze der schwereren Halogene zuerst niederschlägt. Dieser Umstand bietet insofern einen Vorteil, da das Silberchlorid nur schwer aus den Schnitten entfernt werden kann. Da das Chlorsilber im Licht reduziert wird, und da das entstehende Produkt nur

---

[1]) *Justus*, Über den physiologischen Jodgehalt der Zelle. 2. Mitteilung. Virchows Archiv. **176**. 1 (1905).

[2]) *Justus*, Über den physiologischen Jodgehalt der Zelle. Virchows Archiv. **170**. 501 (1902).

schwer beseitigt werden kann, so ist es folglich um so besser, je weniger am Anfang gebildet wird.

Die Schnitte werden nun in konzentriertes, chemisch reines Glyzerin eingelegt. Zum Einbetten kann man nicht eins der gewöhnlichen anderen Mittel gebrauchen, denn die in diesen Fällen erforderlichen Klärungsflüssigkeiten, wie ätherische Öle, Zedernöl, Nelkenöl und selbst Balsam, reduzieren die Quecksilberjodidverbindungen. Alkohol und Xylol sind ebenfalls nicht geeignet. Sogar in Glyzerin verändern die Präparate bereits nach höchstens 24 Stunden ihre Farbe.

Die, wie beschrieben, eingebetteten Schnitte können nun unter dem Mikroskop mit einem *Abbe*schen Kondensator geprüft werden, indem das Diaphragma weit aufgemacht wird. Das vorhandene Mercurijodid wird auf diese Weise als rote Verbindung nachgewiesen.

Daß die für diese Präparate zu gebrauchenden Reagenzien absolut frei von Jod sein müssen, dürfte hier wohl nicht erst hervorzuheben sein.

Verfasser besitzt auf dem Gebiete der beschriebenen Methode eine nur sehr beschränkte Erfahrung, und er kann folglich auch nicht über den Wert dieses Verfahrens ein entscheidendes Urteil fällen. Von theoretischem Gesichtspunkte aus könnte es in zweifacher Hinsicht kritisiert werden. Zunächst fragt es sich, ob es genügt, das Präparat nur 1—2 Minuten dem Chlorwasser auszusetzen, um eine solche Menge Jod aus den maskierten Verbindungen frei zu machen, daß es dann wirklich nachgewiesen werden kann. Auf Grund dieses Bedenkens hat *Macallum* auch bei dem Gebrauch dieser Methode die fragliche Zeit zur Einwirkung des Chlorwassers auf 10 Minuten ausgedehnt. Allerdings wird dadurch der zweite vorzubringende Einwand nur noch verstärkt. Dieser beruht nämlich darauf, daß das frei gemachte Jod, das in Form von Jodid vorhanden ist, von der Stelle, wo es in Freiheit gesetzt wird, an einen anderen Ort des Präparates und selbst in das Chlorwasser diffundieren muß. Es kann also demnach die unter dem Mikroskop beobachtete Verteilung des roten Quecksilberjodids in einem Gewebsschnitt nicht als sicheres Merkmal für die wirkliche ursprüngliche Verteilung des Jods in derartigen Geweben gelten.

Trotz dieser Einwände muß man die Methode von *Justus* zum mikrochemischen Nachweis der Lokalisation des organischen Jods in Geweben gebrauchen, denn es ist bis heute noch keine bessere zu diesem Zwecke bekannt. Die damit erhaltenen Resultate dürfen aber jedenfalls nur mit Vorbehalt unter Berücksichtigung der oben ausgeführten Einwendungen verwertet werden.

G. Phosphor in Phosphorsäure und in Nucleinverbindungen.

Phosphor findet sich in Tier- und Pflanzenzellen in anorganischer Form in Phosphaten und in „maskierter“ oder organischer Form in den Phosphatiden, Phosphorproteinen, Nucleinsäuren (Nucleoproteiden). Über die Art, in der Phosphor in Phosphorproteinen, im Vitellin, Kristallin und Caseino-

gen gebunden ist, können wir noch nichts aussagen. Wir wissen aber, daß er im Lecithin, in der Nucleinsäure in Form der Ester der Phosphorsäure vorkommt. Nach den Untersuchungen von *Levene* und *Mandel* [1]), *Levene* und *Jacobs* [2]) und anderen kann für die Zusammensetzung der einfachsten Nucleinsäuren, z. B. der Inosin- und Guanylsäure, folgendes Schema angenommen werden:

```
       HO
O =  >P — Zucker-Purin.
       |
       OH
```

In den komplizierteren Nucleinsäuren, z. B. in der Hefenucleinsäure, ist eine Verkettung mehrerer Moleküle des einfachen Esters, wie folgt, anzunehmen:

```
       OH
O=P<  — Zucker-Adenin
      >O
O=P<  — Zucker-Guanin
      >O
O=P<  — Zucker-Cytidin
      >O
O=P<  — Zucker-Uridin.
       OH
```

Cytidin und Uridin sind Verbindungen von noch unbekannter Konstitution. Wir wissen aber, daß sie bei der Hydrolyse mit Säuren Cytosin und Uracil liefern (*Levene* und *Jacobs*).

Es ist noch nicht bestimmt, wie das Proteinmolekül im Nucleoproteid mit dem Phosphorsäureester verbunden ist. Man weiß nur, daß es lose gebunden ist, was schon aus der Leichtigkeit, mit der es bei der peptischen und pankreatischen Verdauung gespalten wird, hervorgeht. Aus diesem Grunde sollte das Proteinmolekül bei der Untersuchung auf Phosphorsäure in der Praxis keine Schwierigkeiten bieten.

Die betreffenden Bestimmungen sind aber doch mit gewissen Schwierigkeiten verknüpft, die in der Konstitution des Esters bedingt sind. In diesem sind die Eigenschaften der Phosphorsäure-Atomgruppe durch Kräfte modifiziert, die gewöhnlich auf sogenannte „sterische Hindernisse" zurückgeführt werden. Die erwähnte Atomgruppe gibt nicht die Reaktionen der Phosphorsäure. Sie ist in Säuren unlöslich und bildet mit löslichen Alkalien oder mit löslichen Baryum- und Calciumsalzen keine Phosphate, ausgenommen nur nach mehr oder weniger langdauernder Behandlungsweise. Ferner gibt sie auch die Ammoniummolybdatreaktion nur schwer.

---

[1]) *P. A. Levene* und *Mandel*, Über die Konstitution der Thymo-Nucleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. **41**. 1905 (1908).

[2]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. **41**. 2703 (1908); **42**. 1198, 2102, 2469, 2474 und 2703 (1909); Über die Hefe-Nucleinsäure III. **43**. 3150 (1910).

Die Phosphorsäure wird indessen aus dem Ester durch Erwärmen der Nukleinsäure oder der Nukleoproteide mittelst Barytwassers oder mit Natriumhydrat- oder Kaliumhydratlösungen in Freiheit gesetzt. Die Säure verbindet sich dabei mit der freimachenden Base zu Phosphat. Nach *Osborne* und *Harris*[1]) wird aus der Triticonukleinsäure durch 2%ige Schwefelsäure in einer halben Stunde 22·8% ihrer gesamten Phosphormenge als Phosphorsäure frei gemacht. *Schmiedeberg*[2]) fand, daß die aus den Köpfen der Spermatozoen des Lachsen isolierte Nukleinsäure bei halbstündigem Erhitzen mit 5%iger Salzsäure 11·43% und möglicherweise 19·9% des Phosphors als Phosphorsäure freigemacht wird. *Scott*[3]) äußerte sich später dahin, daß diese Angaben nicht zurecht beständen. Er meinte, daß Mineralsäuren, z. B. Salpeter- und Salzsäure, den Phosphor auf die angegebene Weise nicht aus den Nukleoproteiden frei machen. Seine Ausführungen haben sich aber nicht als zutreffend erwiesen. Auch *A. B. Macallum*[4]) konnte zeigen, daß aus Hefenukleinsäure oder aus *Hammarstens* Pankreasnukleoproteid durch die Einwirkung von 30%iger Salpetersäure bei 35° bereits Phosphorsäure erhalten wird, und daß die Menge der letzteren nach 2 Tagen noch bedeutend vermehrt ist. Dasselbe Ergebnis wurde auch von *Nasmith* und *Fidlar*[5]) mit den Nukleoproteiden der Hoden des Ochsen erhalten. Diese Resultate stehen übrigens im Einklang mit der nach den Untersuchungen von *Levene* und *Jacob* anzunehmenden Konstitution der Nukleinsäuren. Diese Autoren ließen verdünnte Schwefelsäure in Konzentrationen von 2–5% auf verschiedene Nukleinsäuren einwirken, um die Zuckerpurinverbindung aus dem Molekül zu lösen. Dabei wurde die Phosphorsäure als solche frei gemacht. Die Temperatur betrug dabei entweder 125° C oder 150° C während einer Einwirkungsdauer von 4—8 Stunden oder auch nur 50° C, aber dann während 2—3 Tagen. Sie konnten dabei bestimmt feststellen, daß Mineralsäuren aus der Hefenukleinsäure Purin- und Pyrimidinverbindungen, d-Ribose und Phosphorsäure in Freiheit setzen, und daß selbst ganz verdünnte Lösungen dieser Säuren praktisch zu demselben Resultat führen.[6]) Es ist daher anzunehmen, daß, wenn verdünnte Lösungen der Mineralsäuren bei 50° C und darüber Phosphorsäure freimachen, dasselbe auch durch stärkere Lösungen von Salpetersäure von 35° C bei mehrtägiger Einwirkung auf Nukleine und Nukleinsäuren geschieht.

[1]) *T. B. Osborne* und *J. F. Harris*, Die Nukleinsäure des Weizenembryos. Zeitschrift f. physiol. Chem. **36**. 85 (1902).

[2]) *Schmiedeberg*, Über die Nukleinsäure der Lachsmilch. Archiv f. exp. Pathol. und Pharmakogn. **43**. 57 (1899).

[3]) *F. H. Scott*, On methods supposed to localize phosphorus in cells. Journ. of Physiolog. **35**. 119 (1907).

[4]) *A. B. Macallum*, The action of nitric acid on the phosphorus of nucleoproteids and paranucleoproteids. Proc. Soc. Experim. Biolog. and Med. **4**. 70 (1907).

[5]) *G. Nasmith* and *E. Fidlar*, A criticism of the nitro molybdate method for the detection of phosphorus in tissues. Journ. of Physiolog. **37**. 278 (1908).

[6]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über die Hefe-Nukleinsäure. III. Bericht d. Deutsch. chem. Gesellschaft. **43**. 3150 (1910).

Ganz anders als den erwähnten Substanzen gegenüber verhält sich nun die Salpetersäure zum Caseinogen. *A. B. Macallum*[1]) fand, daß eine Salpetersäure vom spez. Gew. 1·2 (HNO_3 = 32%) bei 35° C selbst nach zweiwöchentlicher Einwirkung nicht die geringste Menge Phosphor als Phosphorsäure freimacht, und daß nach 2 Monaten nur winzig kleine Spuren der letzteren nachzuweisen sind. Daraus geht also zweifellos hervor, daß zwischen der Art der Phosphorbindung in Nukleinverbindungen und andrerseits derjenigen in den Phosphorproteiden ein wesentlicher Unterschied besteht.

Nach dem oben Gesagten ist es klar, daß das Reagens, das zum makrochemischen Nachweis der Phosphorsäure zu benutzen ist, auch unter gewissen Bedingungen bei der mikrochemischen Untersuchung die Phosphorsäure aus den betreffenden Nukleinverbindungen frei macht und demonstriert. Das Reagens, das für diesen Zweck gebraucht wird, ist das Salpetersäuremolybdat von Fresenius. Es wird so dargestellt, daß genau 1 Teil reiner Molybdänsäure (M_0O_3) in 4 Teilen starken Ammoniaks (spez. Gew. 0·88) gelöst wird, und daß dann langsam 15 Teile Salpetersäure vom spez. Gew. 1·2 hinzugesetzt werden. Diese Lösung zeigt eine hellgelbe Färbung und liefert bei eintägigem Stehen einen geringfügigen Satz, von dem die klare Flüssigkeit abgegossen wird. Man bewahrt sie in einer mit Glasstopfen verschlossenen Flasche auf.

Das erwähnte Reagens soll, wenn es in reichlicher Menge zu einer Zwanzigstelnormallösung eines Phosphates gefügt wird, sofort einen Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat erzeugen. Wenn sich dagegen der Niederschlag bei Zimmertemperatur erst nach einiger Zeit bildet, ist das Reagens für unsere Zwecke nicht gebrauchsfähig, denn eine Verzögerung in der Bildung der Fällung kann Diffusion und Wiederverteilung der Phosphorsäure nach sich ziehen.

Der bei dieser Reaktion gebildete Niederschlag besteht aus Ammoniumphosphormolybdat, welches, wenn das vorhandene Phosphat reichlich und frei von Proteinen vorhanden ist, in Form von oktaedrischen Kristallen auftritt, das aber andrerseits, wenn eine Mischung von Phosphorsäure oder Phosphaten mit Eiweißlösungen vorliegt, einen mehr oder weniger amorphen Charakter, der durch die Gegenwart des Eiweißes bedingt wird, zeigt. In dem letzteren Falle kann man nur nach mehrmaligem Wiederlösen des amorphen Produktes in Ammoniak und Fällen mit Salpetersäure die charakteristischen Kristalle erhalten.

Die gelbe Färbung des Niederschlages genügt bereits, um seine Gegenwart in dem Reagensglas oder in einem Schnitte zu erkennen, falls die Phosphorsäure in beträchtlicher Menge vorhanden ist. Wenn sie aber in Lösungen oder in einem Gewebe oder Zellelement nur in sehr geringfügigen Mengen auftritt, kann die gelbe Farbe allein nicht ausreichend sein, um eine deutliche Unterscheidung zwischen der Phosphorsäurereaktion und der

---

[1]) *A. B. Macallum*, loc. cit.

gelben Xanthoproteinreaktion zu gestatten, die in Geweben durch Einwirkung der Salpetersäure des Reagenzes stattfindet.

Im Reagensglas ist der Grad der Empfindlichkeit derart, daß man noch einen erkennbaren Niederschlag in einer Lösung erhält, in der 1 Teil P_2O_5 in 40.000 Teilen vorhanden ist. Der Empfindlichkeitsgrad kann unter Zuhilfenahme einer additionellen Reaktion bedeutend erhöht werden. Das dabei zu gebrauchende Reagens ist das Phenylhydrazinhydrochlorid. Die Reaktion beruht auf der Eigenschaft dieser Substanz, die Molybdänsäure in Verbindung mit der Phosphorsäure, der Phosphormolybdatsverbindung, in Gegenwart von Salpetersäure zu dem blauen Oxyd des Molybdäns zu reduzieren. Wird eine 1—2%ige Lösung des Phenylhydrazinhydrochlorids im Reagensglas zu einer Mischung des salpetersauren Molybdänreagenzes und eines Phosphates gefügt, so findet augenblicklich Reduktion der Molybdänsäure zu dem blauen Oxyd statt, das, mit dem Gelb des Niederschlages zunächst dunkelgrün erscheint, aber nach einigen Sekunden deutlich blau wird. Für diese Reaktion ist nicht erforderlich, daß das Phosphormolybdat in Niederschlagsform vorliegt. Sind nur Spuren von Phosphorsäure vorhanden, die nicht zu einer Niederschlagsbildung genügen, so erhält man auf Zusatz weniger Tropfen der Phenylhydrazinlösung sofort eine deutliche grüne Färbung. Diese Reaktion ist so empfindlich, daß sie noch 1 Teil P_2O_5 in 135.000 Teilen Wasser, das mit salpetersaurem Molybdatreagens, und zwar mit der vierfachen Menge seines Volumens gemischt ist, anzeigt, daß sie also 1 Teil in über 675.000 Teilen der Mischung, oder auf Phosphor bezogen, 1 Teil P in 3,000.000 Teilen der Lösung nachweist. Unter dem Mikroskop ist die Reaktion auch bei weitem empfindlicher. Diese große Empfindlichkeit ist hauptsächlich auf den Umstand zurückzuführen, daß in der Ammoniumphosphormolybdänverbindung 18 bis 24 Moleküle MoO_3 auf je ein Molekül P_2O_5 entfallen. So sind also bei Vorhandensein von nur 1 Molekül P_2O_5 bereits 18—24 Moleküle MoO_3 gegenwärtig, die der reduzierenden Wirkung des Phenylhydrazins ausgesetzt werden. Wie sich das Phosphorpentoxyd dabei verhält, kann noch nicht erklärt werden.

Das Phenylhydrazin wirkt in der erwähnten Weise auf das salpetersaure Molybdat allein nicht ein, so lange es dem letzteren auch ausgesetzt werden mag. Das Phenylhydrazin wird allerdings durch die Salpetersäure unter Bildung von rötlichen oder violettgefärbten Verbindungen oxydiert, diese sind aber keineswegs mit der Farbe, die durch Reduktion der Molybdänsäure entsteht, zu verwechseln. Wird der Molybdänsäure Alkohol in gewisser Konzentration zugefügt, so entsteht auf Zusatz des Phenylhydrazins eine grünlichblaue oder blaue Färbung. Zugabe von Kaliumhydrat- und von Natriumhydratlösungen verursachen einen ähnlichen Effekt. Die blaue Farbe der Alkoholmischung verblaßt für gewöhnlich innerhalb 24 Stunden. Sie scheint auf der Bildung einer aromatischen Verbindung zu beruhen und nicht etwa direkt auf einer Veränderung der Molybdänsäure.

Bei Vorhandensein von Globulinen und Albuminen verursacht das Phenylhydrazin, in Gegenwart von Phosphorsäure und Phosphaten, keine Reduktion des Salpetersäuremolybdatreagenzes.

A. B. Macallum[1]) hat mit Lösungen von Eialbumin und Eiglobulin, die mittelst wiederholten, mindestens achtmaligen Fällungen der Lösungen der Proteine des Weißes vom Ei durch Sättigen mit reinem Ammoniumsulfat gewonnen worden waren, mit dem Salpetersäuremolybdatreagens und Phenylhydrazin keine Reaktion erhalten. Selbst nach einwöchentlicher Einwirkung des Salpetersäuremolybdats bei 35° auf reines Eialbumin und Eiglobulin ruft das Phenylhydrazin keine Reduktion der Molybdänsäure hervor. Es ist daher anzunehmen, daß reine Proteine die fragliche Reaktion auf Phosphorsäure nicht beeinflussen.

Gewebe und Zellen, die in Alkohol gehärtet wurden, halten selbst nach tüchtigem Auswaschen mit Wasser, leicht noch Spuren von Alkohol zurück, und zwar besonders nahe der Ränder der Präparate. Infolgedessen liefern die Schnitte der letzteren häufig, nachdem sie mehrere Tage lang mit dem Salpetersäuremolybdatreagens behandelt worden sind und dann mit einer Phenylhydrazinlösung versetzt werden, eine blaue Reaktion längs der Ränder, wo naturgemäß der Alkohol zuerst in das Gewebe eingedrungen ist. Durch dieses Zurückhalten von etwas Alkohol erwächst also der Untersuchung des mit Alkohol gehärteten Gewebes in bezug auf die fragliche Reaktion zweifellos ein Nachteil.

Die besten Resultate, auf die man sich ohne weiteres verlassen kann, werden an frischen Geweben und Zellen, und zwar in einer für das betreffende Untersuchungsobjekt jeweils angepaßten Weise erhalten. Wenn es sich nur darum handelt, den anorganischen Phosphor, das ist die Phosphorsäure der Phosphate, zu bestimmen, so gebraucht man eine Methode, die etwas verschieden ist von der, welche zum örtlichen Nachweis vom Phosphor der Phosphorsäureester, wie in der Nukleinsäure und im Lecithin, benutzt wird.

Im ersteren Falle wird das Material, möge es unizellular oder in Form gefrorener Schnitte frischen Gewebes vorliegen, in das Salpetersäuremolybdatreagens, dem eben vorher etwas einer 2%igen Phenylhydrazinhydrochloridlösung zugesetzt wurde, gelegt. Es genügt, wenn man 1 cm^3 der Phenylhydrazinlösung zu je 5 cm^3 des Reagenzes bringt. Auf diese Weise werden die Phosphate bereits nach wenigen Sekunden erkenntlich gemacht. Das Phenylhydrazin reduziert auf einmal alle Molybdänsäure im Reagens, das sich in Kontakt mit der Phosphorsäure befindet und, da das blaue Molybdänoxyd unlöslich ist, so kann sein Vorkommen in einem Schnitte über die Verteilung der Phosphorsäure ohne weiteres unterrichten. Nach Verlauf weniger Minuten, nach denen sich bereits das Maximum der Reaktion entwickelt hat, werden die Schnitte in Wasser gewaschen, dann auf einen Objekt-

[1]) Über die Art und Weise, in der die wiederholte Fällung vorgenommen werden kann, vgl. ***Macallum***, Proc. Roy. Soc. B. **76** (l. c.). 224—226 (1905).

träger gebracht und in Glyzerin eingebettet. Wenn es sich dagegen um unizelluläre Gebilde handelt, so benutzt man zu ihrer Abtrennung eine einfache Zentrifuge. Durch wiederholtes Zentrifugieren einer Suspension in destilliertem Wasser werden die Zellen dann von dem Salpetersäuremolybdatreagens befreit. Nun werden sie mittelst einer Pipette auf einen Objektträger gebracht und hier in Glyzerin eingebettet. Derartige Präparate sind nicht sehr lange haltbar, nicht länger als wenige Wochen. Sie sind aber andrerseits sehr wertvoll, da sie in sehr empfindlicher Weise und sehr deutlich die Verteilung der Phosphorsäure zeigen.

Für den Nachweis des Phosphors der Phosphorsäureester kann die beschriebene Methode unter Berücksichtigung einer gewissen Modifikation gebraucht werden. Dabei kommt es zunächst darauf an, daß alle Spuren der Phosphate entfernt werden. Da Ammoniumphosphormolybdat in Ammoniak sehr leicht löslich ist, so ist das zu prüfende und bereits einige Minuten lang mit Salpetersäuremolybdat behandelte Material frei an anorganischem Phosphor, nachdem es wiederholt mit einer 10%igen Ammoniaklösung extrahiert worden ist. Nun werden die Präparate, möge es sich um einzellige Organismen oder um gefrorene Schnitte von frischen Geweben oder Organen handeln, in eine neue Portion des Salpetersäuremolybdatreagenzes in eine absolut reine Glasstopfenflasche gebracht, die in einem Wärmeschrank bei 35° C für 1—4 oder 5 Tage aufbewahrt wird. Darauf werden die Präparate in destilliertem Wasser gewaschen und, nachdem sie 3 oder 4 Minuten lang mit einer 2%igen Phenylhydrazinhydrochloridlösung behandelt worden sind, auf einen Objektträger gebracht und in Glyzerin eingebettet. Die Schnitte der alkoholgehärteten Gewebe werden, nachdem sie mit Phenylhydrazin behandelt sind, gänzlich in Wasser gewaschen, mit Alkohol entwässert, in Zedernöl oder in Xylol geklärt und schließlich in Balsam eingebettet.

Die Gegenwart von Lecithin in derartigen Gewebspräparaten verursacht eine Komplikation. Obgleich das Lecithin auf Grund seiner Unlöslichkeit und demnach seiner Impermeabilität für das Reagens nicht leicht von der Salzsäure des Reagens angegriffen wird, so gibt es doch nach einer gewissen Zeit etwas von seinem Phosphor als Phosphorsäure ab, wodurch zu Mißverständnissen in bezug auf Bestimmung der Phosphorsäure, die auch aus Nukleinsäuren und Nukleoproteiden stammt, Veranlassung gegeben ist. Man darf jedenfalls solche Präparate allein nicht für stichhaltig ansehen. Man muß sich vielmehr noch einer anderen, und zwar der folgenden Methode bedienen: Gefrorene Schnitte von frischem Gewebe werden vier oder fünf Stunden lang in absolutem Alkohol belassen, dann dieselbe Zeitdauer in Äther, worauf sie zum allergrößten Teile, wenn nicht vollständig, vom Lecithin befreit sind. Nun werden sie für 1—3 Tage lang bei 35° C in das Salpetersäuremolybdatreagens gelegt, darnach mit der 2%igen Phenylhydrazinlösung behandelt, in Wasser gewaschen, in Alkohol entwässert, in Xylol oder in Zedernöl geklärt und endlich in Balsam eingebettet.

In solchen Präparaten wird die durch das Reagens freigemachte Phosphorsäure durch eine blaue oder blaugrüne Färbung von reduziertem MoO_3 angedeutet. Es ist hierbei allerdings noch eine Bemerkung einzufügen. Nicht selten geben nämlich die Fibrillen von Collagengewebe nach erwähnter Behandlungsweise ebenfalls eine blaue Reaktion, während jedoch die Collagenfasern nach *Bensleys*[1]) Annahme keine Phosphate enthalten.[2]) *Bensley* machte deshalb auch darauf aufmerksam, daß die Behandlung mit dem Salpetersäuremolybdatreagens und darauf folgender Einwirkung des Phenylhydrazinhydrochlorids durchaus nicht als zuverlässige Methode zum Nachweis von „maskiertem" Phosphor in Geweben angesehen werden könne. Wir geben wohl zu, daß die fragliche Methode nicht fehlerlos ist, und daß sie mit gewisser Vorsicht gebraucht werden muß; andrerseits sind wir aber nach unseren heutigen Kenntnissen über diesen Punkt berechtigt, die Annahme von *Bensley*, daß Zytoplasma und Collagengefüge frei von anorganischen und organischen Phosphorverbindungen seien, kaum als begründet ansprechen zu können. Es mag ferner bemerkt werden, daß MoO_3 durch die Gegenwart von Phosphorsäureester so beeinflußt werden kann, daß Phenylhydrazinlösungen es reduzieren, und daß infolgedessen, wenn eine kolloidale Lösung von MoO_3 auf einen Gewebsschnitt einwirkt, und wenn nach Reduktion mit dem Phenylhydrazin eine blaue Färbung im Präparate auftritt, dadurch kein Beweis für die Unzuverlässigkeit der Salpetersäuremolybdatmethode als Probe auf organischen Phosphor gegeben ist.

H. Schwefelsäure als Sulfate.

Der Nachweis von Schwefelsäure, die in Form von Sulfaten in Geweben vorhanden ist, kann z. B. im Falle von Ausscheidungen von Sulfaten in der Niere oder bei der Absorption von Sulfaten im Darm vorzunehmen

---

[1]) Über Erwägungen und Kritik der *Bensley*schen Ansichten vgl. *A. B. Macallum*, Ergebnisse der Physiologie. Die Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie in der biologischen Forschung. 7. 637—644 (1908).

[2]) *Bensley* versichert, daß durchaus kein Grund vorliegt, anzunehmen, daß Collagenfasern Phosphate enthalten. Daraufhin möchten wir jedoch fragen, ob auch nur irgend ein stichhaltiger Grund diese Annahme zu stützen vermag. Im Gegenteil! *Siegfried* (Habilitationsschrift, Leipzig 1892) nimmt an, daß die Retikularstruktur des drüsenartigen Gewebes in Lymphdrüsen, Magenschleimhaut, Leber, Milz und Niere aus Collagen und einer von ihm Retikulin benannten Substanz besteht, die 0·34% Phosphor enthält. *Tebb* behauptet dagegen, daß das Retikulin von *Siegfried* in Wirklichkeit nur ein künstliches Derivat des Collagens darstellt, und daß der gefundene Phosphor nur auf das angewandte Darstellungsverfahren zurückzuführen ist. *Siegfried* (Journ. of Physiol. 28. 319) bleibt jedoch trotzdem bei seiner Annahme bestehen. *Morochowetz* (Verhandlungen des naturhistorisch-mediz. Vereins Heidelberg. Bd. 1) fand, daß das Cornealgewebe 20·4% Leimsubstanz und 1% Asche enthält. Gelatine, die bekanntlich eine leimartige Substanz ist, weist immer anorganische Salze und unter diesen auch Phosphate auf. Wenn auch bisher noch keine sorgfältigen und eingehenden Untersuchungen über die Zusammensetzung von Bindegeweben ausgeführt worden sind, so kann man doch sicher annehmen, daß sie — beständig von Flüssigkeit, die anorganisches Material gelöst enthält, umgeben — nicht nur völlig rein organisch zusammengesetzt sind.

sein. *A. B. Macallum* hat für diesen Zweck folgende wirksame Methode gefunden:

Das zu untersuchende Organ (Niere oder Darm) muß vollständig frisch sein und mittelst eines Kohlensäure-Gefriermikrotoms geschnitten werden. Jeder Schnitt wird, während er gefroren und noch flach ausgebreitet ist, in eine $\frac{n}{10}$-Lösung von Bleiacetat gebracht und darin mindestens 10 Minuten lang liegen gelassen. Die Bleiverbindungen, welche dann im Schnitte vorhanden sind, bestehen hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich, aus dem Acetat, Chlorid, Phosphat und Sulfat. Sie werden alle, mit Ausnahme des Sulfates, durch Auswaschen, zuerst mit Wasser, dann mit $\frac{n}{10}$-Salpetersäure in 2—5 Minuten entfernt. Die Säure wird schließlich auch in Wasser ausgewaschen und nun der betreffende Schnitt auf einen Objektträger gebracht, dann eingebettet, und zwar mit einem Tropfen Glyzerin und Ammoniumsulfid, das durch Sättigen einer Ammoniumlösung vom spez. Gew. 0·96 mit Schwefelwasserstoffgas bereitet wurde. Nachdem man ein Deckgläschen aufgesetzt hat, ist das Präparat zur mikroskopischen Untersuchung bereit. Die Verteilung des Bleisulfates im Schnitte wird durch die Bleisulfidreaktion nachgewiesen, die je nach der vorhandenen Konzentration des Bleisulfates braun bis tiefschwarz ausfallen kann.

Das Bleisulfat weist nur eine sehr geringe Löslichkeit auf. 46 Teile $PbSO_4$ lösen sich in 1,000.000 Teilen Wasser bei 18° C.[1]) Diese Schwerlöslichkeit wird praktisch durch die $\frac{n}{10}$-Salpetersäure nicht beeinflußt, während aber Salpetersäure irgend ein vorhandenes Bleiphosphat und Bleichlorid schnell löst. Auf diese Weise wird durch die Sulfidreaktion nur das Bleisulfat nachgewiesen.

Die beschriebene Methode hat sehr gute Dienste geleistet beim Lokalisieren der Sulfate in der Niere, nach Injektion von Sulfaten in den Kreislauf. Mit ihrer Hilfe sind auch sehr interessante Resultate betreffs der Ausscheidung von solchen Sulfaten durch die Darmschleimhaut bei Tieren, in deren Kreislauf Sulfate gebracht worden waren, gezeitigt worden.

I. Salzsäure.

Die Salzsäure des Magensaftes wird von der Magenschleimhaut abgesondert. Bis vor kurzem hatte man noch keinen direkten Beweis für die Gegenwart von Salzsäure in der Schleimhaut unter der freien Oberfläche der letzteren, obgleich man schon sehr lange darnach gefahndet hatte. Bereits im Jahre 1849 hatte *Claude Bernard* dieses Problem zu lösen versucht. Erst 1909 ist die Lösung dieser Frage Miss *M. P. Fitz Gerald*[2]) ge-

[1]) Berechnet aus der elektrischen Leitfähigkeit von *Kohlrausch* und *Rose*, Zeitschrift f. physikal. Chem. **12**. 241, loc. cit. (1893).

[2]) Miss *Fitz Gerald* führte diese Untersuchungen in meinem Laboratorium an der Universität Toronto aus. Die Resultate finden sich in ihrer Veröffentlichung in Proc. Roy. Soc. Bd. **83**. 56 (1910).

lungen. Der Untersuchungsgang, dem sie folgte, war in der Hauptsache der bereits von *Claude Bernard* angewandte, nur mit dem Unterschiede, daß sie anstatt Eisenlactats das Doppelsalz Ammonium-Eisencitrat benutzte. Dieses Salz, das 25—26% Eisen enthält, ist in Lösung absolut neutral. Diese Flüssigkeit kann mit einer Ferrozyankaliumlösung gemischt werden, ohne daß dieselbe auch nach Verlauf einiger Tage, eine Berlinerblaureaktion liefert. Die Gegenwart von Phosphorsäure oder Kohlensäure in der Lösung gibt ebenfalls nicht zur Bildung der blauen Verbindung Veranlassung. Sobald aber Salzsäure selbst in einer so niedrigen Konzentration wie 0·036%[1]) vorhanden ist, tritt die blaue Reaktion sofort ein.

Die gebrauchten Lösungen bestanden aus einer 1·5%igen Ferrozyankalium- und einer 2·25%igen Eisen-, Ammoniumcitratlösung. Von diesen Lösungen wurden gleiche Volumina gemischt und von dieser Mischung Kaninchen 10—45 cm^3 und Meerschweinchen 16—22 cm^3 subkutan nach verschiedenen Intervallen injiziert. Dann tötete man die Tiere nach verschiedenen Zwischenräumen nach der Injektion rasch, nahm den Magen heraus, öffnete ihn, entfernte durch Waschen mit Wasser schnell die Nahrungsreste und brachte ihn dann in eine reichliche Menge absoluten Alkohols. Nach Verlauf von 24 Stunden wurde der Alkohol gewechselt und nach 48 Stunden war das Organ zur Untersuchung bereit. Man kann jetzt einen blauen Fleck von begrenzter Ausdehnung auf der Oberfläche der Schleimhaut, in der Region der kleineren Curvatur, beobachten. Nun macht man Schnitte von diesem Teil und von anderen Cardiateilen, entweder mit freier Hand oder mit dem Gefriermikrotom, entwässert, klärt mit Xylol und bettet in Xylolbalsam ein. Unter dem Mikroskop betrachtet, läßt sich allerdings bei den meisten der Schnitte unter der Oberfläche der Schleimhaut keine blaue Färbung erkennen, bei einigen kann man aber doch die begrenzte Zone bemerken, in der eine blaue Ablagerung im Lumen des oberen Drittels und in einem Teile des mittleren Drittels der Drüsenröhrchen und in den Kanälchen, die sich vom Lumen in die Parietalzellen erstrecken. Nicht selten erscheint bei manchen Tieren eine deutliche blaue Reaktion nur in den Lymphgefäßen in dem drüsenartigen Gewebe zwischen den Drüsenschläuchen.

[1]) Nach der Veröffentlichung der Miss *Fitz Gerald*schen Arbeit (l. c.) hat Verf. feststellen können, daß, bei sorgfältiger Ausführung, noch bei Gegenwart von 0·014% Salzsäure in einer Lösung von Ferrozyankalium und Eisen-, Ammoniumcitrat Berlinerblau gebildet wird.

Arbeitsmethoden zur Untersuchung des intermediären Stoffwechsels.

Von **Otto Neubauer**, München.

Einleitung.

Die Untersuchung des intermediären Stoffwechsels setzt sich als Aufgabe, den Aufbau der im Verdauungskanal resorbierten Nahrungsstoffe zu Körperstoffen (Gewebssubstanzen), den Umbau von Körperstoffen in andere und endlich ihren Abbau zu den in den Exkreten erscheinenden Endprodukten aufzuklären. Zur Erreichung dieses Zieles wendet sie so ziemlich alle biochemischen und experimentellen Methoden an, die in den übrigen Kapiteln dieses Werkes beschrieben sind. Von einer besonderen Technik kann hier nur in dem Sinne gesprochen werden, als die Art der Fragestellung, die zweckentsprechende Anordnung des Versuchsplanes und die kritische Verwertung der Versuchsergebnisse mancherlei Besonderheiten zeigen, die häufig in ähnlicher Weise wiederkehren. Andrerseits verlangt jedes neue Problem eine besondere Anwendungsweise der Untersuchungsmethoden; dementsprechend kann im folgenden nur ein Überblick über die Wege geboten werden, die zu den bisher gewonnenen Ergebnissen geführt haben, nicht eine auch für neue Forschungen immer ausreichende Arbeitstechnik.

Leider haben die Resultate der einzelnen Versuche in diesem schwierigen Gebiet selten absolute Beweiskraft, sondern meist nur den Wert von Wahrscheinlichkeitsgründen. Dieser Mangel kann zum Teil dadurch ausgeglichen werden, daß die Ergebnisse einer Methode durch die anderer Methoden kontrolliert werden. Die Geschichte der Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß hat gezeigt, wie unter dem Drängen einer strengen, die höchsten Anforderungen stellenden Kritik vorläufige Ergebnisse durch fortgesetzte Arbeit endgültig gesichert werden können.

In vielen Fällen müssen Erwägungen allgemeinerer, erkenntnistheoretischer Art herangezogen werden. So hat das Prinzip, daß die einfachste Erklärung der bekannten Tatsachen auch als die wahrscheinlichste zu gelten hat, wiederholt Anwendung gefunden, und sich besonders bei der Verwertung pathologischer Prozesse für die Aufklärung intermediärer

Stoffwechselvorgänge als fruchtbar erwiesen (Azetonkörperausscheidung, Alkaptonurie). Natürlich darf niemals vergessen werden, daß derartige Schlußfolgerungen auch irreführen können und daß ihnen nicht der Wert erwiesener Tatsachen beigemessen werden darf, sondern nur die Bedeutung von Arbeitshypothesen, die weiterer Prüfung zu unterziehen sind.

* *
*

Die Grundlage für die Untersuchung des intermediären Stoffwechsels bildet die genaue Kenntnis der chemischen Eigenschaften der Körpersubstanzen, respektive der mit ihnen im allgemeinen identischen Nahrungsstoffe, mit Einschluß ihrer Derivate. Eine systematische Forschung auf diesem Gebiete konnte infolgedessen erst mit der Zeit einsetzen, als die Chemie der Kohlehydrate, Fette, Eiweißkörper und Nukleinsubstanzen aufgeklärt war.

Der chemische Aufbau einer Substanz läßt in manchen Fällen ohne weiteres ihre Beziehungen zu anderen Körpersubstanzen erkennen; so ist die Entstehung der Homogentisinsäure aus den aromatischen Kernen des Eiweißes, der Diamine aus den Diaminosäuren, der Glykuronsäure aus dem Zucker schon nach der chemischen Formel durchaus wahrscheinlich. Jedoch kann eine solche Überlegung auch zu falschen Schlüssen führen; so hat sich die Vermutung, daß die Zuckerbildung aus Eiweiß von dem kohlehydratartigen Komplex der Eiweißkörper abhängt, als unrichtig erwiesen.

Mit der Kenntnis der chemischen Eigenschaften eines Körpers ist ferner, da die Gesetze der Chemie in ihrem vollen Umfange auch für den lebenden Körper gelten, von vornherein eine Orientierung darüber gegeben, welche Umsetzungen im Organismus zu erwarten sind. Man kann im allgemeinen annehmen, daß Reaktionen, die in vitro sehr leicht eintreten, auch im Körper in ähnlicher Weise ablaufen. Beispiele dafür geben: die Oxydationen von Aldehyden zu Säuren, von Harnsäure zu Allantoin, die Abspaltung von Kohlensäure aus Ketonsäuren und Diaminosäuren, die Abspaltung von Ammoniak aus Amiden, der Übergang von Cystin in Cystein, die Umlagerung von Fruchtzucker in Traubenzucker, die Hydrolyse von Eiweißkörpern, Fetten, Polysacchariden und Nukleinsäuren.

Besonders nahe liegt es, solche Reaktionen, die außerhalb des Körpers bei gewöhnlicher Temperatur ohne Einwirkung von Reagenzien sozusagen automatisch stattfinden, auch im Organismus anzunehmen. Das sind vor allem eine Reihe von sogenannten Gleichgewichtsreaktionen (umkehrbaren Reaktionen). Wenn kohlensaures Ammoniak, dessen Bildung im Tierkörper aus dem abgespaltenen Ammoniakrest der Aminosäuren und der allenthalben verfügbaren Kohlensäure wohl ohne weiteres vorausgesetzt werden darf, sich außerhalb des Körpers von selbst zum Teil in karbaminsaures Ammoniak umlagert, so wird man mit Wahrscheinlichkeit annehmen dürfen, daß auch im Organismus ein ähnlicher Vorgang eintritt. Zwingend ist aber eine solche Schlußfolgerung keineswegs; es ist wohl möglich, daß

im Tierkörper der Ablauf solcher Gleichgewichtsreaktionen irgend welche Hemmungen erfährt. Durch die morphologische Struktur, durch welche in den Geweben lauter kleinste, voneinander mehr weniger abgeschlossene Räume geschaffen sind, deren Wände eine für verschiedene Stoffe verschiedene Durchlässigkeit besitzen, muß der Ablauf solcher umkehrbarer Reaktionen in hohem Maße beeinflußt werden.

Auch sonst muß man sich hüten, extra corpus gewonnene Erfahrungen ohne weiteres auf den Organismus zu übertragen: so wird die leicht oxydierbare Oxalsäure im Tierkörper nicht verbrannt, im gesunden Organismus kommt es nicht zum Zerfall von Azetessigsäure in Azeton und Kohlensäure. Andrerseits vollbringt der Organismus oft mit großer Leichtigkeit Leistungen, die der Chemiker im Laboratorium nicht oder nur sehr unvollkommen nachahmen kann: die Verbrennung von Bernsteinsäure, die Oxydation von Purinbasen zu Harnsäure, die Umwandlung von Eiweiß in Zucker, von Zucker in Fett, den Abbau des Blutfarbstoffes zu Gallenfarbstoff, die Synthese der Hippursäure aus Benzoesäure und Glykokoll. Allerdings ist mit der Ausbildung der Laboratoriumstechnik die Zahl derjenigen biochemischen Vorgänge, die nicht nachgeahmt werden können, immer kleiner geworden. So ist durch Einführung des Wasserstoffsuperoxyds als Oxydationsmittel auch die Überführung von Fettsäuren in β-Oxyfettsäuren, die im Reagensglas lange Zeit als undurchführbar galt, möglich geworden. Diese Erfahrung, daß hier die Oxydation durch Wasserstoffsuperoxyd in analoger Weise verläuft wie die Oxydation im Tierkörper, hat die Anregung dazu gegeben, durch genaues Studium der Einwirkung dieses Oxydationsmittels auf verschiedene Substanzen des Tierkörpers neue Anhaltspunkte für die weitere Erforschung des intermediären Stoffwechsels zu gewinnen. Über die Technik solcher Oxydationen mit Wasserstoffsuperoxyd siehe dieses Werk Bd. IV, S. 714. Etwas ähnliches gilt von der Einwirkung des Sonnenlichtes auf organische Substanzen[1]) und von dem elektrolytischen Abbau.[2])

Die Kenntnis der chemischen Struktur der Körpersubstanzen erlaubt es ferner, bereits bekannte Prozesse in der Weise weiter aufzuklären, daß man sie sich in verschiedene Phasen zerlegt denkt. Die Annahme, daß die Zersetzungen im Organismus in zeitlich zerlegbaren Stufen verlaufen, hat sich als Arbeitshypothese bestens bewährt. Wenn z. B. als festgestellt gelten kann, daß die Ketonsäuren im Körper in die um 1 C-Atom ärmeren Fettsäuren übergehen, $R - CO - COOH + O = R - COOH + CO_2$, so ergibt sich aus dieser Bruttoformel, daß hier eine Oxydation und eine Kohlensäureabspaltung vorliegt. Da nun Ketonsäuren ohne Spaltung einer weiteren Oxydation nicht zugänglich sind, so muß angenommen werden, daß zunächst die Kohlensäureabspaltung, dann erst die Oxydation eintritt; mit an-

---

[1]) *Neuberg*, Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten. Biochem. Zeitschr. Bd. **13**. S. 305 (1908); Bd. **27**. S. 271 (1910); Bd. **29**. S. 279 (1910).

[2]) *Neuberg, Scott* und *Lachmann*, Elektrolytischer Abbau von Mono- und Disacchardsäuren sowie von Oxyaminosäuren. Biochem. Zeitschr. Bd. **24**. S. 152 (1910).

deren Worten, daß als intermediäres Produkt der Aldehyd auftritt, der dann die Oxydation zur Fettsäure erfährt.

Entscheidend für das Studium des intermediären Stoffwechsels sind aber nur diejenigen Methoden, die am lebenden Organismus (am gesunden und am kranken) oder mit isolierten Organen arbeiten.

I. Untersuchungen am normalen Organismus.

A. Chemische Untersuchung frischer normaler Organe.

Alle Substanzen, die in normalen Organen nachweisbar sind, müssen, soweit sie nicht als solche im Darmkanal resorbiert worden sind, und soweit sie sich nicht durch völlig unveränderten Übertritt in die Exkrete als Endprodukte des Stoffwechsels erweisen, als Zwischenprodukte betrachtet werden.

Um zu sicheren Resultaten zu kommen, ist es unerläßlich, daß die Organe sofort nach dem Tode untersucht werden, da manche Stoffe sonst sehr leicht weiter verändert werden, z. B. Glykogen, Cystein. Im allgemeinen empfiehlt es sich, das frische Organ sofort auf Siedetemperatur zu erhitzen, um die vorhandenen Fermente unwirksam zu machen. Über die Methodik der chemischen Untersuchung der Organe siehe die entsprechenden Kapitel dieses Werkes. Als intermediäre Produkte sind auf diesem Wege sichergestellt: Traubenzucker, Glykogen, Milchsäure, Fett, Fettsäuren, Glyzerin, Inosit, Glykokoll, Arginin, Hypoxanthin, Kreatin, Adrenalin, Thyreojodin, ferner die spezifischen Eiweißstoffe der Gewebe. Diese sind, da sie von den Eiweißkörpern der Nahrung in ihrer quantitativen Zusammensetzung größtenteils sehr bedeutend abweichen, ebenfalls als Produkte des intermediären Stoffwechsels aufzufassen, die aus dem Nahrungseiweiß erst durch eingreifende Umbauprozesse entstehen müssen.

* * *

Günstige Bedingungen für das weitere Studium solcher Umbauprozesse bietet die Untersuchung von Organismen, bei welchen durch längere Zeit keine Nahrungsaufnahme stattfindet. Es kommt da weniger die Entziehung der Nahrung bei höheren Tieren in Betracht, weil in diesen Fällen die Abbauprozesse bei weitem überwiegen. Das klassische Objekt für solche Untersuchungen ist der Lachs[1], der während seines monatelangen Aufenthaltes in den Flüssen keine Nahrung aufnimmt und doch während dieser Zeit seine mächtigen Geschlechtsorgane aufbaut; so wachsen die Eierstöcke, die bei dem im Dezember gefangenen „Winterlachs" nur 0·4% des Körpergewichtes ausmachen, bis Anfang August auf 3—6% und dann bis zur Laichzeit (erste Hälfte November) auf 19—27% des Körpergewichtes heran. Das Material wird von dem stark abmagern-

[1]) *F. Miescher*, Die histochemischen und physiologischen Arbeiten. Leipzig 1897. S. 116, 192, 304, 359.

den Seitenrumpfmuskel geliefert. Zum Studium dieser mächtigen Stoffwanderung sind vergleichende Organuntersuchungen an Basler Rheinlachsen gleicher Körperlänge, die zu verschiedenen Zeiten (vor allem zwischen Anfang August und erster Hälfte November) gefangen sind, geeignet.

Tierische Organismen, an welchen Umbauprozesse ohne störende Nahrungsaufnahme untersucht werden können, sind ferner befruchtete, sich entwickelnde Eier. *A. Kossel*[1]) verglich den Purinbasengehalt im Dotter frischer und 14 Tage lang bebrüteter Hühnereier und bewies auf diesem Wege, daß bei der Entwicklung des Hühnerembryos eine Synthese von Purinbasen stattfindet. *Lafayette, B. Mendel* und *S. Leavenworth*[2]) demonstrierten in ähnlich angeordneten Versuchen an Hühner- und Enteneiern auch die Neuentstehung furfurolbildender Substanz (Pentosen). *B. A. Levene*[3]) verglich die Verteilung des Stickstoffes in unbebrüteten 1, 10, 19 Tage lang bebrüteten Hühnereiern; vor der Untersuchung wurde das Eigelb mechanisch vom Eiweiß abgetrennt. *Abderhalden* und *Kempe*[4]) haben zur Prüfung der Frage, ob im tierischen Organismus ein Umbau von Aminosäuren stattfindet, den Gehalt von Hühnereiern an Tyrosin, Glutaminsäure und Glykokoll (nach totaler Hydrolyse) in verschiedenen Stadien der Bebrütung verglichen, konnten aber keine überzeugenden Unterschiede feststellen.

Bei solchen Vergleichen und Versuchen an Hühnereiern verschiedener Stadien sollen Eier aus demselben Hühnerhofe von der nämlichen Hühnerrasse und von möglichst gleichem Gewicht verwendet werden; am besten Eier derselben Henne.[5]) Die Schale und die Schalenhaut, die bei der Bildung des Hühnchens nur in sehr geringem Maße Verwendung finden[6]), wurden meist nicht mit untersucht. Der Eiinhalt (Eiweiß, Eigelb und der sich entwickelnde Embryo) werden entweder innig gemischt und zusammen untersucht oder man untersucht den Embryo getrennt. Das reife Hühnchen wird sofort nach dem Auskriechen getötet, zerschnitten, auf einer Glasplatte fein zerhackt und in einer Reibschale zu einer gleichmäßigen homogenen Masse zerrieben. Aliquote Teile dienen zu der quantitativen Bestimmung.[7])

[1]) *A. Kossel,* Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **10**. S. 248 (1886).

[2]) *Lafayette, B. Mendel* und *S. Leavenworth,* Changes in the Purine-, Pentose- and Cholesterolcontent of the developing egg. Americ. Journ. of Physiol. Bd. **21**. S. 77 (1908).

[3]) *B. A. Levene,* Embryochemische Untersuchungen. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **35**. S. 80 (1902.)

[4]) *Abderhalden* und *Kempe,* Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt von befruchteten Hühnereiern in verschiedenen Entwicklungsperioden an Tyrosin, Glykokoll und Glutaminsäure. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **53**. S. 398 (1907).

[5]) *Tangl* und *Mituch,* Beiträge zur Energetik der Ontogenese. V. Mitt. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **121**. S. 437 (1908).

[6]) S. aber *Tangl,* Untersuchungen über die Beteiligung der Eischale am Stoffwechsel des Eiinhaltes während der Bebrütung. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **121**. S. 423 (1907).

[7]) *Liebermann,* Embryochemische Untersuchungen. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **43**. S. 71 (1888).

Tangl und *Farkas* [1]) haben Untersuchungen an Fischeiern angestellt; sie fanden im bebrüteten Forellenei ein Objekt, in welchem eine Neubildung von Fett stattfindet.

Auch Insekteneier sind zu solchen Untersuchungen herangezogen worden. So die Eier des Seidenspinners, Bombyx mori. (Die Eier oder sogenannte Samen) des Tieres werden im Innern des Mutterleibes befruchtet und zu 400—500 vom Weibchen im Sommer abgelegt. Sie entwickeln sich im Sommer nur bis zu einer gewissen Stufe und ruhen dann in diesem Stadium den ganzen Winter. Sie können aus Seidenraupenzuchtanstalten in größerer Menge und in gleichartiger Qualität bezogen werden. Im Januar oder Februar kann man die Eier dann zur weiteren Entwicklung anregen, indem man sie in ein geheiztes Zimmer (22—25° C) bringt. Die Räupchen schlüpfen in zwei Wochen aus. *Tichomiroff* konnte durch Vergleichen der Zusammensetzung der Eier vor der Bebrütung und nach 13tägiger Bebrütung die Neuentstehung von Purinbasen feststellen.

Die Insekten sind auch im Chrysaliden-(Puppen-)Stadium geeignete Objekte zum Studium chemischer Umbauprozesse. Im Puppenstadium erfahren die Insekten bekanntlich eine tiefgreifende Metamorphose, indem fast alle Organe sehr bedeutende Veränderungen durchmachen, deren Ergebnis die geschlechtsreife Form ist; dabei werden aus der Außenwelt keine Nährstoffe aufgenommen. Während dieser Zeit finden neben gewebseinschmelzenden Abbauprozessen auch gewebsbildende Aufbauprozesse in großem Umfange statt. Eine solche Neubildung ist unter anderem die Entstehung des Chitins. An den Puppen des Seidenspinners haben gearbeitet: *O. Kellner*, *E. Bataillon* und *E. Couvreur*, *Kotake* und *Sera* und *K. Farkas*. [3])

Ferner ist von *Abderhalden* und seinen Mitarbeitern [4]) auch an diesem Objekt die Frage geprüft worden, ob eine Neubildung von Aminosäuren im Organismus vorkommt; sie haben untersucht, ob bei der Produktion der an Tyrosin, Glykokoll und Alanin reichen Seide diese Aminosäuren neugebildet werden oder ob die sich einspinnende Raupe diese Bausteine aus

---

[1]) *Tangl* und *Farkas*, Beiträge zur Energetik der Ontogenese. IV. Mitt. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **104**. S. 624 (1904).

[2]) *Tichomiroff*, Chemische Studien über die Entwicklung der Insekteneier. Zeitschrift f. phys. Chem. Bd. **9**. S. 518 (1885).

[3]) *O. Kellner*, Chemische Untersuchung über die Entwicklung und Ernährung des Seidenspinners. Landwirtschaftl. Versuchsstationen. Bd. **30**. S. 59 (1883); Bd. **33**. S. 381 (1887). — *E. Bataillon* und *E. Couvreur*, La fonction glycogénique chez le ver à soie pendant la métamorphose. Compt. rend. de la soc. de biol. Bd. **44**. S. 469 (1892). — *Couvreur*, Sur la transformation de la graisse en glycogène chez le ver à soie pendant la métamorphose. Ebenda. Bd. **47**. S. 796 (1895). — *Kotake* und *Sera*, Findet eine Umwandlung von Fett aus Glykogen bei der Seidenraupe während der Metamorphose statt? Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **62**. S. 115 (1909). — *Farkas*, Beiträge zur Energetik der Ontogenese. III. Mitt. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **98**. S. 490 (1903).

[4]) *Abderhalden* und *Dean*, Studien über die Bildung der Seide. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **59**. S. 170 (1909). — *Abderhalden* und *Weichardt*, Die Monoaminosäuren des Körpers des Seidenspinners. Ebenda. Bd. **59**. S. 174 (1909).

ihrem Körperbestand hergibt, also bei der Verpuppung an ihnen verarmt; das letztere ist der Fall:

Hydrolysierte Seidenraupen enthielten, in Prozent des Gesamt-N:
10·2% Glykokoll, 8·7% Alanin, 4·3% Tyrosin.

Hydrolysierte Schmetterlinge:
3·5% Glykokoll, 3·2% Alanin, 1·6% Tyrosin.

Weinland[1]) bevorzugt als Untersuchungsobjekt die Puppe der Fleischfliege (Calliphora vomitoria), die sich im Gegensatz zum Seidenspinner auch im rauheren Klima während des Sommers in beliebiger Menge züchten läßt. Bei der Züchtung verfährt er in der Weise, daß er Pferdefleisch, das im Groben von Fett befreit ist, durch die Fleischhackmaschine schickt. Auf den Brei, dem zum Aufsaugen der oft reichlich sich abscheidenden Flüssigkeit Filtrierpapier beigegeben wird, werden einige Exemplare der Fleischfliege gesetzt. Nach einem bis spätestens zwei Tagen hat das Tier seine Eier abgelegt. Wenn die Larven nach weiterem Ablauf von fünf oder mehr Tagen die für die Verpuppung nötige Größe erreicht haben, gibt man ihnen Gelegenheit, den Behälter zu verlassen und sich an lichtgeschützten Stellen, z. B. unter dunklem Papier, zu sammeln und zu verpuppen. Das Puppenstadium dauert 13—14 Tage. Durch reichliche Wärmezufuhr kann es eventuell abgekürzt werden. Zu Beginn der Verpuppung und nach verschiedenen Zeitintervallen werden Proben von 100—1000 Stück entnommen und chemisch untersucht (Fettgehalt, Glykogen, Stickstoffgehalt usw.). *Weinland* fand eine Zersetzung von Fett und N-haltiger Substanz sowie Bildung von Kohlehydraten (Chitin). Das zersetzte N-haltige Material war ausreichend, um die Neubildung von Kohlehydrat zu decken.

* * *

Weitere Aufschlüsse für die Kenntnis intermediärer Stoffwechselvorgänge bringen ferner Untersuchungen an Organen von Tieren, die vorher unter einseitige Ernährungsbedingungen gesetzt worden sind. Man kann z. B. manche Körpersubstanzen, die bei gewöhnlicher Ernährung zugeführt werden, aus der Nahrung ausschalten. Bleibt trotzdem der Körperbestand erhalten und das Tier dauernd gesund, so ist bewiesen, daß es imstande ist, die betreffenden Substanzen aus anderen Nahrungsbestandteilen zu bilden. So läßt sich zeigen, daß der Organismus bei völlig oder fast völlig purinfreier Nahrung (Milch, Eier) erhalten werden kann, trotzdem täglich Purinkörper mit dem Harn ausgeschieden werden; er muß also imstande sein, die für die Zellkerne wichtigen Purinsubstanzen synthetisch aufzubauen. Besonders schlagend sind diese Versuche, wenn sie an wachsenden Tieren ausgeführt werden und diese sich trotzdem in normaler Weise weiterentwickeln. *Burian* und *Schur*[2]) haben von zwei Tieren (Kaninchen, Hunde)

[1]) *E. Weinland*, Über die Stoffumsetzungen während der Metamorphose der Fleischfliege. Zeitschr. f. Biol. Bd. **47**. S. 186 (1906).

[2]) *Burian* und *Schur*, Über Nukleinbildung im Säugetierorganismus. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **23**. S. 55 (1897).

desselben Wurfes das eine sofort getötet und den Purinbasengehalt des Körpers bestimmt. Das andere, gleich große Tier wurde erst nach Beendigung der Stillungsperiode getötet und zur Analyse verwendet. Es ergab sich, daß außer dem Körpergewicht auch der Purinbasengehalt des Organismus sehr bedeutend zugenommen hatte, trotzdem die Tiere nur Milch, also purinfreie Nahrung, aufgenommen hatten. Daraus schließen sie mit Recht, daß irgend eine Gruppe im Eiweißmolekül der Umwandlung in die Puringruppe des Nukleins fähig ist.

In analoger Weise läßt sich die synthetische Bildung des Blutfarbstoffes im Organismus erschließen; ferner die Synthese von Eiweiß aus zugeführten hydrolytischen Spaltungsprodukten, da der Körper auch mit weit abgebautem Eiweiß erhalten werden kann. Durch gleichzeitige Verfolgung der Stickstoffbilanz gewinnen diese Versuche noch bedeutend an Beweiskraft (siehe weiter unten).

Dagegen ergaben analog angelegte Versuche, daß der Körper nicht imstande ist, aus N-freiem Material und aus anorganischen N-Verbindungen Aminosäuren und Eiweiß aufzubauen, wenigstens nicht in einer für die Erhaltung des Organismus nötigen Quantität und Qualität. Denn zur Erhaltung des Lebens erwies sich in allen bis jetzt durchgeführten Experimenten die Zufuhr vollwertiger Eiweißkörper oder der Summe ihrer hydrolytischen Spaltungsprodukte als unbedingt notwendig.

In gleicher Weise läßt sich zeigen, daß unter den Lipoiden der Nahrung lebenswichtige Stoffe vorhanden sind, die der Organismus aus anderem Nahrungsmaterial nicht bilden kann. *Stepp*[1]) fütterte weiße Mäuse mit Brot, das getrocknet, zerschrotet und 12 Stunden lang im *Soxhlet*schen Apparat mit 95%igem Alkohol und Äther extrahiert worden war. Zur völligen Entfernung des Äthers wurde das Brot in Wasser eingeweicht und der Äther mitsamt dem Wasser bei 40° im Luftstrom verjagt. Mit solchem fett- und lipoidfreiem Brot gefütterte Mäuse konnten nicht länger als höchstens 29 Tage am Leben erhalten werden. Zulage von reinem Fett änderte nichts an diesem Ergebnis, wohl aber Zusatz des Alkoholätherextraktes aus getrockneter Magermilch.

Eine erschöpfende Erkenntnis aller derjenigen lebenswichtigen Körpersubstanzen, die der Organismus nicht selbst aufbauen kann, sondern die ihm unbedingt mit der Nahrung zugeführt werden müssen, wird erst dann erreicht sein, wenn es gelingt, aus chemisch reinen Stoffen eine Nahrung zusammenzusetzen, mit der Tiere dauernd am Leben erhalten werden können. Das ist bisher noch nicht möglich gewesen.[2]) Als Versuchstiere wurden meistens Mäuse gewählt, weil bei ihrer Kleinheit die Beschaffung des nötigen Futterquantums keine Schwierigkeiten verursacht. Nach *Henriques*

---

[1]) *Stepp*, Versuche über Fütterung mit lipoidfreier Nahrung. Biochem. Zeitschr. Bd. 39. S. 452 (1909). — Fütterungsversuche mit lipoidfreier Nahrung. Verhandl. d. 28. Kongresses f. innere Medizin. 1911. S. 234.

[2]) *Lunin*, Über die Bedeutung der anorganischen Salze für die Ernährung des Tieres. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 5. S. 31 (1881).

und *Hansen*[1]. *Falta* und *Noeggerath*[2]) sind aber Ratten für solche Versuche geeigneter. Die Versuche müssen eventuell monatelang fortgeführt werden. Zur Zusammensetzung der künstlichen Nahrung stehen derzeit zur Verfügung:

als Salze: veraschte Milch oder künstlich zusammengesetzte Salzmischungen, z. B. NaCl, KCl, Knochenasche je 50, Na carb. 10 Teile[3]).

als Kohlenhydrate: Stärke, Traubenzucker, Rohrzucker,

als Fett: gereinigtes Tierfett,

als Eiweißkörper: Albumin aus Blut, Fibrin, Hämoglobin, Kasein, Eiereiweiß *(Merck)*, Edestin (Höchster Farbwerke),

ferner nukleinsaures Natron *(Boehringer* oder *Merck)*, Cholesterin *(Merck)*, Lezithin.

Als besonders ergebnisreich haben sich die Versuche erwiesen, durch Verabreichung einer einseitig zusammengesetzten Nahrung die Muttersubstanzen der eigentlichen Reservestoffe des Tierkörpers (Fett und Glykogen) festzustellen.[3])

So gelingt es, einer geistreichen Idee von *Kühne* folgend, in überzeugender Weise die Ablagerung von Nahrungsfett in den Fettdepots des Körpers nachzuweisen: wenn man ein Tier mit einem körperfremden Fett mästet, so läßt sich dieses nachher im Fettgewebe wiederfinden. Um die Bedingungen für einen solchen Versuch möglichst günstig zu gestalten, ist es zweckmäßig, das Tier vorher von seinem eigenen Fett zu befreien. Bei Hunden ist das durch länger dauernden Hunger bis zur Abnahme des Körpergewichtes um gut ein Drittel zu erreichen. Dann erhält das Tier möglichst viel von dem heterogenen Fett neben einer knapp ausreichenden Menge von Eiweiß (fettarmes Fleisch). Eventuell muß das Fett mit der Schlundsonde beigebracht werden. Zur Vermeidung von Diarrhöen wird Zugabe von Ca carb. empfohlen. Nach 2—4wöchentlicher Fütterung wird das Tier getötet, das Fett der Fettdepots durch Auslassen gewonnen und mit dem gewöhnlichen Hundefett verglichen. Dieses besteht aus rund 70% Olein, 30% Palmitin und Stearin. Jodzahl 41—83. Seine Fettsäuren haben einen Schmelzpunkt von 39—41°, einen Erstarrungspunkt von 35° C, eine Jodzahl von ca. 50. Über die Untersuchungsmethoden des Fettes siehe dieses Werk Bd. II, S. 199 und Bd. V, S. 477.

Als körperfremde Fette eignen sich für diese Versuche:

Hammeltalg. Er kennzeichnet sich durch folgende Eigenschaften: weiße Farbe, feste Konsistenz bei gewöhnlicher Temperatur, Schmelzpunkt

[1]) *Henriques* und *Hansen*, Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **43**. S. 417 (1904).

[2]) *Falta* und *Noeggerath*, Fütterungsversuche mit künstlicher Nahrung. Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **7**. S. 313 (1905).

[3]) *Lebedeff*, Über Fettansatz im Tierkörper. Zentralbl. f. d. med. Wissensch. Bd. **20**. S. 129 (1882). — *J. Munk*, Zur Lehre von der Resorption, Bildung und Ablagerung des Fettes im Tierkörper. *Virchows* Archiv. Bd. **95**. S. 407 (1884).

44—51. Jodzahl 32—36. Er enthält vorwiegend Stearin neben Palmitin und wenig Olein (16%).[1])

Rüböl ist flüssig, enthält viel Olein, daneben auch Erucin (Glyzerid der Erukasäure). *Munk*[2]) hat folgende Methoden eingeschlagen, um es aus dem flüssigen Anteil des Fettes zu isolieren: Abkühlen auf 0 Grad, wobei sich das Erucin abscheidet. Verseifen mit alkoholischer Natronlauge. Überführung der Seifen in Pflaster durch Kochen mit Bleizuckerlösung. Extraktion des erukasauren Bleis mit warmem Äther; aus dem Bleisalz wird die Fettsäure durch Zersetzen mit verdünnter Schwefelsäure auf dem Wasserbad und Extraktion mit Äther in Freiheit gesetzt und aus kaltem Alkohol umkristallisiert. Der Schmelzpunkt für die reine Erukasäure soll 33—34° betragen. Doch gelang es *Munk* nicht, die Säure völlig rein zu erhalten. Ein anderes Verfahren zur Identifizierung der Erukasäure ist folgendes: Die aus dem Fett gewonnenen Fettsäuren werden aus wenig kaltem, absolutem Alkohol umkristallisiert, in Alkohol gelöst, mit alkoholischer Bleizuckerlösung gefällt; der Niederschlag wird abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, bis im Filtrat kein Blei mehr nachweisbar ist, der Niederschlag über Schwefelsäure getrocknet und sein Bleigehalt als $PbSO_4$ bestimmt. Erukasaures Blei verlangt 23·5% Blei, oleinsaures Blei 26·82%, stearinsaures Blei 26·78%, palmitinsaures Blei 28·87%.

Palmöl[3]) enthält kein Stearin, besteht zur Hälfte aus Palmitin und Olein.

Kokosbutter[4]) (reich an Glyceriden niederer Fettsäuren, Jodzahl 8).

Sesamöl (s. dieses Werk, Bd. II, S. 220).

Leinöl[5]) (s. dieses Werk, Bd. II, S. 231).

Lebertran (hohe Jodzahl, 135—176).

Jodfette[6]) (jodiertes Schweinefett oder Jodipin). Die Bestimmung des Jodgehaltes im Körperfett erfolgt entweder nach Veraschung gewichtsanalytisch als PdJ_2 oder zweckmäßiger nach folgendem Verfahren: 0·1—2 *g* des Fettes werden mit alkoholischer Kalilauge verseift, wobei das Jod abgespalten wird. Nach dem Ansäuern der wässerigen Seifenlösung und Zusatz einiger Tropfen von schwefliger Säure (zur Verhinderung der Abscheidung von freiem Jod) wird von den abgeschiedenen Fettsäuren abfiltriert. Die Fettsäuren werden nochmals mit wässeriger Kalilauge verseift; nach abermaliger Abscheidung mittels Schwefelsäure durch dasselbe

---

[1]) *Radziejewski*, Experimentelle Beiträge zur Fettresorption. *Virchows* Archiv. Bd. **43**. S. 268 (1868); Bd. **56**. S. 211 (1872). — *J. Munk*, a. a. O.

[2]) *J. Munk* und *Rosenstein*, Zur Lehre von der Resorption im Darm. *Virchows* Archiv. Bd. **123**. S. 330 (1881).

[3]) *Subbotin*, Beiträge zur Physiologie des Fettgewebes. Zeitschr. f. Biologie. Bd. **6**. S. 73 (1870). — *Munk*, a. a. O.

[4]) *Rosenfeld*, Die Herkunft des Fettes. Verhandl. d. 17. Kongresses f. innere Medizin. 1895. S. 430.

[5]) *Lebedeff*, a. a. O.

[6]) *H. Winternitz*, Über Jodfette und ihr Verhalten im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **24**. S. 425 (1898).

Filter filtriert, mit Wasser gewaschen; die vereinigten Filtrate werden auf ein bestimmtes Volumen gebracht, in einem aliquoten Teil das Jod kolorimetrisch bestimmt.

Walrat, das *Subbotin* verwendete, ist für diese Versuche nicht geeignet. Es steht den echten Fetten offenbar schon zu ferne.

Mit derselben Methodik (Zufuhr eines leicht nachweisbaren körperfremden Fettes) läßt sich nach *Joannovicz* und *Pick*[1]) zeigen, daß die Leber eine sehr wichtige Rolle bei der Fettresorption spielt: nach Zufuhr von Lebertran (je 100 cm^3 an drei aufeinanderfolgenden Tagen) enthält sie sehr große Mengen von Fett mit hoher Jodzahl; da das nach Ausschaltung der Leber aus dem Pfortaderkreislauf (*Eck*sche Fistel) nicht mehr der Fall ist, so kann man annehmen, daß der Leber Nahrungsfett direkt mit dem Pfortaderblut zugeführt wird.

Ferner läßt sich auf diesem Weg der Nachweis erbringen, daß der Organismus imstande ist, zugeführte Fettsäuren zum synthetischen Aufbau von Lipoiden zu verwenden. *Joannovicz* und *Pick*[1]) haben in ihren Versuchen auch die Jodzahl der in den Leberphosphatiden (Acetonfällung des Ätherextraktes) vorhandenen Fettsäuren untersucht und gefunden, daß sie nach Lebertranfütterung ebenfalls ansteigt (Hungerhund: 120, normal gefütterter Hund: 102, mit Lebertran gefütterter Hund: 151). Ferner hat man in den Nieren amerikanischer Rinder ein eigenartiges Phosphatid, das Karnaubon, gefunden; die für dieses Phosphatid charakteristische Fettsäure, die Karnaubasäure, die sonst im Tierkörper nicht vorkommt, ist nun auch in den Baumwollpreßkuchen, die als Mastfutter dienen, reichlich enthalten.[2])

Diese Methode, die Ablagerung von Nahrungsstoffen im Organismus nachzuweisen, ist aber nur bei den fettartigen Stoffen anwendbar. Es gelingt nicht etwa, körperfremde Kohlenhydrate oder gar Eiweißkörper in unveränderter Form als Reservestoffe zum Ansatz zu bringen. Übrigens zeigen die Hammeltalg- und Rübölversuche von *Abderhalden* und *Brahm*[3]), daß im wesentlichen nur das Fett der Fettdepots die charakteristischen Eigenschaften des Nahrungsfettes zeigt, während das eigentliche „Zellfett" in seiner Zusammensetzung von der Art des aufgenommenen Nahrungsfettes unabhängig ist; das „Zellfett" wurde in der Weise gewonnen, daß das getrocknete, mit Äther extrahierte Fleisch durch fünftägige Verdauung mit Magensaft oder durch fünfstündiges Kochen mit der zehnfachen Menge 2%iger Salzsäure aufgeschlossen wurde. Dann wurde filtriert, das

---

[1]) *Joannovicz* und *E. P. Pick,* Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung der Leber bei der Fettresorption unter normalen und pathologischen Verhältnissen. Wiener klin. Wochenschr. Jg. **23**. S. 573 (1910).

[2]) *Dunham* und *Jacobson,* Über Carnaubon. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **64**. S. 302 (1910); s. auch [1]).

[3]) *Abderhalden* und *Brahm,* Ist das am Aufbau der Körperzellen beteiligte Fett in seiner Zusammensetzung von der Art des aufgenommenen Nahrungsfettes abhängig? Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **62**. S. 330 (1909).

Filtrat und der getrocknete Filterrückstand mit Äther extrahiert. Das extrahierte Fett wurde mit alkoholischer Natronlauge verseift; die Fettsäuren wurden abgeschieden und ihr Schmelzpunkt und Erstarrungspunkt festgestellt.

Ein anderer Weg, um die Muttersubstanzen des Körperfettes kennen zu lernen, besteht darin, daß man ein Tier möglichst fettarm macht; wenn es dann gelingt, durch reichliche Zufuhr einer Substanz eine Anreicherung des Körpers an Fett zu erzielen, so darf man schließen, daß die so gebildete Substanz als Muttersubstanz des Fettes anzusehen ist: Mastmethode.

F. Hofmann [1]) hat mit dieser Methode den Ansatz von Nahrungsfett im Körper bewiesen. Er hat gezeigt, daß eine einseitig fettreiche Nahrung die im Körper vorhandene Fettmenge vermehrt.

Ein kräftiger, ausgewachsener (aber nicht alter), längere Zeit mit Fleisch gefütterter Hund machte eine 30tägige Hungerperiode durch, während deren er von 26·5 auf 16 *kg*, also um mehr als ein Drittel seines Körpergewichtes abnahm; nach Erfahrungen an Kontrolltieren kann angenommen werden, daß er nach dieser Vorbehandlung fast fettfrei ist. Dann wird er durch 5 Tage mit wenig Fleisch und großen Mengen Speck gefüttert und getötet. Die Fettbestimmung in der Nahrung, im Kot und im Darminhalt ergibt, daß während der Fütterungsperiode 1854 *g* Fett und 39·7 *g* Eiweißstickstoff resorbiert worden ist.

Der Körper des Tieres enthält . . . . 1353 *g* Fett
Davon könnte aus dem verfütterten Eiweiß stammen höchstens . . . . . . 131 *g* [2]) „
Von dem verabreichten Fett sind also zum Ansatz gekommen annähernd . . . . 1222 *g* Fett.

Die Bestimmung des Fettes in der Nahrung und in den Geweben erfordert besondere Genauigkeit. Methoden siehe dieses Werk Bd. II, S. 199 und Bd. V, S. 477.

In analoger Weise wurde die Bildung von Fett aus Kohlenhydraten bewiesen. Man macht die Tiere möglichst fettarm, mästet dann mit einem kohlenhydratreichen, aber möglichst fettarmen und eiweißarmen Futter, tötet die Versuchstiere nach einer angemessenen Zeit und bestimmt die Zunahme des Körperfettes durch Vergleich mit Kontrolltieren, die schon am Ende der Unterernährungsperiode (respektive Hungerperiode) getötet worden sind. Ist die Zunahme an Fett größer, als aus den geringen Fettmengen der Nahrung und dem während der Mastperiode zersetzten Eiweiß (dessen Menge aus dem N-Gehalt des Harnes berechnet wird [2])

---

[1]) *Franz Hofmann*, Der Übergang von Nahrungsfett in die Zellen des Tierkörpers. Zeitschr. f. Biologie. Bd. 8, S. 153 (1872).

[2]) Unter Zugrundelegung der *Henneberg*schen Zahl: aus 100 *g* Eiweiß können rein rechnerisch im Maximum 51·39 *g* Fett neben 33·45 *g* U und 27·4 *g* CO_2 entstehen. (Neue Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. Landwirtschaftl. Versuchsstationen. 22. 393.)

erklärt werden kann, so ist die Bildung von Fett aus Kohlenhydrat erwiesen. Am geeignetsten für derartige Versuche sind Tiere, bei denen eine Fettmast erfahrungsgemäß besonders leicht zu erzielen ist, also vor allem Schweine und Gänse. Gänse haben vor größeren Tieren noch den Vorteil, daß eine verläßliche Fettbestimmung im Gesamtorganismus sehr viel leichter durchführbar ist.

Als Beispiel diene ein Versuch *Chaniewskis*[1]) an zwei Gänsen vom Gewicht 2381 *g* (Kontrolltier) und 3706 *g* (Versuchstier). Nach einer fünftägigen Hungerperiode wurde das Kontrolltier getötet, der Eiweißgehalt (456·47 *g*) und der Fettgehalt (92·41 *g* = 3·25%) bestimmt.

Das eigentliche Versuchstier wird dann durch 15 Tage mit einem Gemisch von Gerste und Reis von bekanntem Eiweiß- und Fettgehalt gemästet. In den gesammelten Exkrementen wird bestimmt: das nicht resorbierte Fett (15·9 *g*), der Gesamtstickstoff (40·8 *g*), der als U vorhandenene N (11·4 *g*) und der ätherlösliche (0·4 *g*). Der nicht als U-N oder als ätherlöslicher N vorhandene Stickstoff (29·0 *g*) wird als nicht resorbierter Nahrungs-N betrachtet. Am Schluß der Mastperiode wird das Tier getötet, dann der Eiweiß- und Fettgehalt bestimmt. Es ergibt sich folgende Bilanz:

Gehalt des Versuchstieres bei Beginn der Mästung (berechnet aus den Zahlen des Kontrolltieres, unter Berücksichtigung des Körpergewichtes) . . .	483·8 *g* Eiweiß	97·7 *g* Fett
Gehalt des Versuchstiers am Schlusse der Mästung (direkt bestimmt)	489·2 *g* „	542·9 *g*[2]) „
Masteffekt	5·4 *g* Eiweiß = 0·8 *g* N.	445·2 *g* Fett

Von diesem Fett ist gedeckt:

Durch Fett aus der Nahrung: zugeführt mit der Nahrung 24·6, zurückgefunden im Kot 15·9, also wirklich resorbiert . . . . . . 8·7 *g*

Aus Eiweiß: zugeführter Nahrungs-N	45·8	
nicht resorbiert	29·0	
resorbierter N	16·8	
als Eiweiß angesetzter N	0·8	
bleibt zur Fettbildung im günstigsten Fall zur Verfügung Eiweiß entsprechend	16·0 *g* N.	
Diese bedeuten 100 *g* Eiweiß; aus diesen können sich nach *Henneberg* (s. oben) höchstens bilden		51·4 *g*
Durch Fett und Eiweiß gedeckter Teil des Mastfettes		60·1 *g*
Masteffekt (s. oben)		445·2 *g*
Ungedeckt, also aus Kohlenhydrat entstandenes Fett		385·1 *g*

[1]) *Chaniewski*, Über Fettbildung aus Kohlenhydrat im Tierorganismus. Zeitschr. f. Biologie. Bd. **20**. S. 189 (1884).

[2]) Im Original ein Druckfehler.

Die Bildung von Fett aus Eiweiß hat sich dagegen auf diesem einfachen Fütterungsweg noch nicht einwandfrei beweisen lassen. Da die Möglichkeit eines Übergangs von Eiweiß in Fett heute nicht mehr bezweifelt werden kann (sind doch die beiden Teilstrecken Eiweiß-Zucker, Zucker-Fett exakt festgelegt), so liegt das offenbar daran, daß die Versuchsbedingungen zu ungünstig waren.

Franz Hofmann[1]) glaubte in den wachsenden Fliegenmaden ein Objekt gefunden zu haben, an dem sich die Bildung von Fett aus Eiweiß analytisch demonstrieren ließe. Er setzte Fliegeneier auf defibriniertes Blut, dessen Fettgehalt bestimmt war, und untersuchte dann den Fettgehalt der erwachsenen Maden. Gegen diese Versuche erhob *Pflüger* unter anderem den prinzipiellen Einwand, daß hier die Mitwirkung von Bakterien nicht auszuschließen sei.

In ausgedehntester Weise wurde die Mastungsmethode benutzt, um die Quellen des zweiten wichtigen Reservestoffes, des Glykogens, zu erforschen. Auch hier geht man in analoger Weise vor, indem man das Tier zuerst möglichst glykogenfrei macht und dann die zu prüfende Substanz in großer Menge zuführt. Findet man dann eine Zunahme des Glykogengehaltes gegenüber Kontrolltieren, so wird man annehmen können, daß die verfütterte Substanz in Glykogen übergegangen ist. Es ist jedoch wichtig, zu beachten, daß solche Schlußfolgerungen nicht durchaus zwingend sind. Man kann einwenden, daß die verfütterte Substanz vielleicht nicht selbst in Glykogen übergegangen ist, sondern zu anderen Zwecken im Organismus verwendet worden ist und dadurch andere, im Körper vorhandene Stoffe zur Glykogenbildung disponibel gemacht hat (Ersparnistheorie). Auch noch in anderer Weise kann eine solche „indirekte" Glykogenbildung zustande kommen: man hat gefunden, daß auch Substanzen, die als Energieträger gar nicht ernstlich in Betracht kommen (Harnstoff, Ammoniaksalze, Amide, Narkotika, Antipyretika, Adrenalin), eine Glykogenvermehrung bewirken können. Man hat also bei einem positiven Ausfall des Glykogenmastungsversuches immer noch an die Möglichkeit zu denken, daß die verabreichte Substanz kein echter Glykogenbildner ist, sondern ein „Pseudoglykogenbildner"[2]); bei der Deutung sind vor allem die quantitativen Verhältnisse maßgebend.

Es ist selbstverständlich, daß die Kontrolltiere den eigentlichen Versuchstieren möglichst ähnlich sein sollen an Rasse, Größe, Ernährungszustand und daß eine große Anzahl von Kontrolltieren zu untersuchen ist. Der Ermittlung der günstigsten Versuchsbedingungen ist eine große Anzahl von Arbeiten gewidmet worden; es handelt sich vor allem darum, durch eine geeignete Vorbehandlung das Glykogen möglichst vollständig und sicher aus dem Körper zu entfernen, so daß der Glykogengehalt der

[1]) *F. Hofmann*, Der Übergang von Nahrungsfett in die Zellen des Tierkörpers. Zeitschr. f. Biol. Bd. 8. S. 153 (1872).

[2]) *Cremer*, Physiologie des Glykogens in Asher-Spiros Erg. d. Physiol. Bd. I. Biochemie. S. 803 (1902).

Kontrolltiere auf ein Minimum reduziert ist. Die zur Verfügung stehenden Methoden sind:

a) Im Hunger nimmt der Glykogengehalt rasch ab; doch hat schon *Claude Bernard* gezeigt, daß man durch Hunger Tiere nicht sicher glykogenfrei machen kann. Der Glykogengehalt hungernder Tiere ist auch bei scheinbar gleichen Lebensbedingungen sehr großen individuellen Schwankungen unterworfen und ganz unberechenbar.[1]) *Pflüger*[2]) fand bei einem Hunde am 28. Hungertag noch 4·785% Glykogen in der Leber und 0·158 in den Muskeln, also im ganzen Körper von 33·6 *kg* noch 52·5 *g* Glykogen.

b) Kohlenhydratfreie Kost. Mit ihr ist noch weniger als durch vollständiges Hungern wirkliche Glykogenfreiheit zu erzielen. Als Vorbereitung für den Versuch ist aber eine derartige Ernährung sehr wohl brauchbar. Eine möglichst kohlenhydratarme Kost ist die reine Fleischfettkost. Doch ist zu berücksichtigen, daß das Fleisch immer geringe Mengen von Glykogen enthält, besonders das Pferdefleisch, weniger das Ochsenfleisch; sehr arm an Kohlehydraten ist nach *Pflüger*[3]) das Kabliaufleisch, das in der Regel nur einige Hundertstel Prozent Glykogen enthält; in manchen Fällen allerdings bis zu 0·3%. Der Kohlenhydratgehalt des Fleisches muß also in jedem entscheidenden Versuch eigens bestimmt werden.

c) Durch anstrengende Muskelarbeit wird ebenfalls der Glykogengehalt beträchtlich herabgesetzt; das Verfahren hat den Vorteil, relativ wenig eingreifend zu sein, ist aber nicht im Stande, das Glykogen bis auf die letzten Spuren zu entfernen. Die Methode wurde besonders bei Hunden angewendet in Form der Tretbahnarbeit.[4])

d) Schwere Krämpfe wirken offenbar in analoger Weise. *Külz*[5]) hat gezeigt, daß speziell Strychnin ein Mittel ist, um Kaninchen glykogenfrei zu machen. Methodik siehe weiter unten. Beim Frosch versagt die Methode oder muß wenigstens durch längere Zeit angewendet werden.

e) Einwirkung von Kälte, z. B. Eintauchen in kaltes Wasser, so daß die chemische Wärmeregulierung in Anspruch genommen wird.[6])

f) Phlorhizin. *Mering* hatte ursprünglich angegeben, daß es mit Hilfe von Phlorhizin gelingt, Tiere rasch glykogenfrei zu machen; doch

[1]) *E. Külz*, Beiträge zur Kenntnis des Glykogens. Festschr. f. *C. Ludwig*, Marburg 1890. — *Aldehoff*, Über den Einfluß der Karenz auf den Glykogenbestand von Muskel und Leber. Zeitschr. f. Biol. Bd. **25**. S. 137 (1889).

[2]) *Pflüger*, Über den Glykogengehalt der Tiere im Hungerzustand. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **91**. S. 119 (1902).

[3]) *Pflüger*, Prof. Dr. *Mohrs* neue Versuche über die Entstehung von Glykogen aus Eiweiß. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **126**. S. 516 (1909).

[4]) *Bendix*, Über physiol. Zuckerbildung nach Eiweißdarreichung. Zeitschrift für physiol. Chem. Bd. **32**. S. 479 (1901).

[5]) *Külz*, a. a. O.

[6]) *E. Külz*, Über den Einfluß der Abkühlung auf den Glykogengehalt d. Leber. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **24**. S. 46 (1881).

stellte sich später heraus, daß man manchmal doch noch recht beträchtliche Mengen von Glykogen finden kann.[1])

g) Viele Gifte, wie Phosphor, Arsen, vermögen den Glykogengehalt der Organe zu vermindern, setzen aber gleichzeitig so schwere anderweitige Veränderungen, daß einfache Versuchsbedingungen nicht gegeben sind.

In praxi ist es empfehlenswert, diese Verfahren miteinander zu kombinieren; besonders wichtig ist es, daß man dann im richtigen Zeitpunkt den eigentlichen Versuch beginnt, respektive das Kontrolltier tötet, im allgemeinen möglichst bald nach dem letzten glykogenvermindernden Eingriff. Wartet man längere Zeit, so kann sich Glykogen wieder neu gebildet haben. Diese Tatsache, die der Aufmerksamkeit der Autoren lange entgangen ist, dürfte viele Verschiedenheiten in den Versuchsresultaten erklären. Narkotika sollen nicht verwendet werden, da unter ihrem Einfluß besonders leicht eine Neubildung von Glykogen stattfindet.

Beispiele derartiger erprobter Kombinationen sind folgende Vorschriften:

Bendix[2]): Hunde werden etwa 8 Tage lang mit sehr fettreicher Nahrung (Schmalz), der nur sehr wenig Hackfleisch zugefügt ist, gefüttert, wobei sie stark an Gewicht abnehmen. Es folgen 2 Tage vollständiger Karenz; am darauffolgenden Tage laufen die Tiere auf der von *Zuntz* konstruierten Tretbahn 4 Stunden in schnellem Tempo bergan (im Minimum 10 *km* mit einer Steigung von mehr als 2000 *m*). In Leber und Muskel finden sich dann nur noch Spuren von Kohlehydraten.

E. Pflüger, der an den Methoden der Glykogenverarmung sehr strenge Kritik geübt hat, hat schließlich folgende Methode[3]) für geeignet erklärt:

Man läßt Hunde von 5—10 *kg* 10 Tage lang hungern (Wasser wird gegeben); an den 3 letzten Hungertagen erhält das Tier jeden Morgen eine subkutane Einspritzung von 1 *g* Phlorhizin; 7 Stunden nach der letzten Injektion wird das Tier getötet. Die Leber enthält nun weniger als 0·1 (0·0567)%, die Muskulatur weniger als 0·3 (durchschnittlich 0·198)% Glykogen. Das Maximum von Kohlenhydrat, das in einem solchen 10 *kg* schweren Hund noch vorhanden sein könnte, berechnet sich nach *Pflüger* folgendermaßen:

In der Leber, Gewicht 340 *g*, Prozentgehalt 0·0567	0·193 *g*
In dem übrigen Körper, wenn man den Gehalt der Muskeln dafür einsetzt, was sicher viel zu hoch ist	19·3 *g*
Freier Zucker der Säfte	10·0 *g*
	29·493 *g*

[1]) *Külz* und *Wright*, Zur Kenntnis der Wirkung des Phlorhidzins u. Phloretins. Zeitschr. f. Biol. Bd. **27**. S. 181 (1890).

[2]) *Bendix*, Über die physiologische Zuckerbildung nach Eiweißdarreichung. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. **32**. S. 479 (1901).

[3]) *Pflüger* und *Junkersdorf*, Über die Muttersubstanz des Glykogens. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **131**. S. 201 (1910).

Bei Kaninchen ist die auf die Untersuchungen von *Külz* gegründete Methode, wie sie auch von *Frentzel* und *O. Simon*[1]) benutzt wurde, zu empfehlen: Die Kaninchen werden zunächst 3 Tage lang mit Milch gefüttert, um den Darm von dem voluminösen Pflanzenfutter zu befreien; dann läßt man sie 24 Stunden hungern; darauf wird in viertelstündigen Pausen je 1 cm^3 einer 0·01%igen Lösung von Strychnin. nitricum subkutan injiziert, bis spontan Krämpfe auftreten. Nach dem Ablaufen der Krämpfe werden neue Konvulsionen, z. B. durch leichtes Ziehen an der Pfote, ausgelöst. Wenn die Krämpfe schwächer werden, wird neuerdings injiziert. Bisweilen ist die Einleitung künstlicher Atmung zur Erhaltung des Lebens notwendig. Dieser Zustand wird durch mehrere (5—6) Stunden unterhalten. Die Vergiftung muß sich in lebhaften Krämpfen äußern, wenn man sicher sein will, daß das Glykogen vollständig zum Schwund gelangte. Die Empfindlichkeit gegen das Gift ist bei verschiedenen Tieren verschieden. In der Regel braucht man für ein Kaninchen mittlerer Größe 6—10 Spritzen. Zur richtigen Dosierung ist einige Erfahrung nötig; anfangs geht wohl jedem Experimentator eine Reihe von Tieren zugrunde.

Viele Autoren experimentierten an Hühnern, die mehrere Tage gehungert hatten. Doch ist zu berücksichtigen, daß auch nach 6tägigem Hunger der Glykogengehalt der Hühnerleber bis zu 1% betragen kann und der Glykogengehalt der gesamten Muskulatur noch 1·7 *g*.[2])

Schöndorff[3]) sowie *Blumenthal* und *Wohlgemuth* arbeiteten an Fröschen, welche mehrere Wochen lang ohne Nahrung gehalten worden waren. Der Glykogengehalt der Tiere betrug dann etwa 0·2—0·4%.

Trotzdem es für die meisten der angeführten Vorbereitungsmethoden festgestellt ist, daß sie die Tiere fast glykogenfrei machen, so sind doch bei jeder neuen Untersuchungsreihe neuerliche Kontrollversuche nötig, weil auf diese Weise Zufälligkeiten in den äußeren Bedingungen am besten ausgeschlossen werden.

Nach Abschluß der Vorperiode erhält das Tier die zu prüfende Substanz, und zwar in möglichst reiner Form. Während dieser eigentlichen Versuchsperiode muß der N-Gehalt des Harns und des Kotes kontrolliert werden, um ein Urteil über den Eiweißzerfall zu gewinnen. Diese Periode darf nicht zu kurz sein, weil sonst eventuell keine genügende Glykogenmenge sich bildet. Sie darf aber auch nicht zu lang ausgedehnt werden, weil die Versuchsbedingungen sonst wieder ungünstig werden; denn je länger diese Periode dauert, desto größer wird die Glykogenmenge, die aus dem zerfallenden Körpereiweiß entstanden sein könnte; diese wird

---

[1]) *Frentzel*, Über Glykogenbildung im Tierkörper nach Fütterung mit Holzzucker. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **56**. S. 273 (1894). — *O. Simon*, Zur Physiologie der Glykogenbildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **35**. S. 315 (1902).

[2]) *E. Külz*, Beiträge zur Kenntnis des Glykogens. Festschrift für *C. Ludwig*. Marburg 1890.

[3]) *Schöndorff*, Über die Entstehung von Glykogen auf Eiweiß. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **82**. S. 60 (1900).

aus dem N-Gehalt des Harns berechnet unter Zugrundelegung der Annahme, daß einem Teil N nicht mehr als 5 Teile Zucker entsprechen dürften (siehe weiter unten). Auch aus dem Glyzerin des während dieser Zeit zerfallenden Körperfettes könnte Glykogen entstanden sein; doch ist diese Menge bei dem relativ niedrigen Gehalt des Fettes an Glyzerin nicht groß. Daß auch die Fettsäuren des während dieser Zeit zerfallenden Körperfettes als Glykogenbildner in Betracht kommen, ist nicht anzunehmen. Wollte man auch diese Möglichkeit mit in Rechnung ziehen, so wäre der positive Nachweis, daß ein Stoff ein Glykogenbildner ist, nur in seltenen Fällen möglich.

Dann wird das Tier getötet und sein Glykogengehalt bestimmt. Bei größeren Tieren erstreckt sich die Untersuchung auf Leber und Muskeln, bei kleineren dient am besten der ganze oder der halbe Körper zur Bestimmung.

Ungemein wichtig ist natürlich die Verwendung einer einwandfreien Methode der Glykogenbestimmung. Über die Methoden siehe dieses Werk, Band II, S. 159 und 1070.

Negative Versuche an kachektischen Tieren beweisen nichts. Man soll die vorausgehende Hungerperiode nicht so lange ausdehnen, daß die prämortale N-Steigerung eintritt. Aus diesem Grunde rät *Cremer*[1]), für die Versuche von vornherein fette Tiere zu verwenden. Die Temperatur ist regelmäßig zu messen. Narkotika sind zu vermeiden.

Unter Anwendung dieser „direkten Fütterungsmethode“ ist von *Külz* und durch die Arbeiten der *Voit*schen Schule gezeigt worden, daß vor allem die gärfähigen Kohlenhydrate und ihre Polysaccharide außerordentlich starke Glykogenbildner sind. So konnte eine Kaninchenleber in einem $8^1/_2$stündigen Versuch mit Traubenzucker bis auf 16·85% Glykogen gebracht werden. Die meisten übrigen Kohlenhydrate bewirken ebenfalls eine Glykogenvermehrung, die aber viel geringer ist, so daß eine indirekte Wirkung nicht ausgeschlossen ist. Auch eine Reihe von N-freien Stoffen, die chemisch den Zuckerarten nahestehen, bewirken eine Vermehrung des Glykogens (Glyzerin, Milchsäure). Durch Fett (Fettsäuren) konnte niemals eine Glykogenvermehrung erzielt werden; auch nicht durch Alkohol.

Vor allem ist aber mit Hilfe dieser Methode exakt bewiesen worden, daß auch das Eiweiß ein Glykogenbildner ist, zuletzt unter Beachtung aller nur erdenklichen Fehlerquellen von *Pflüger* und *Junkersdorf*.[2]) Sie fütterten Hunde, die in der oben angegebenen Weise mit Hunger und Phlorhizin vorbehandelt waren, mehrere Tage mit Kabliaufleisch, töteten sie und fanden in der Leber durchschnittlich 6·46%, in den Muskeln durchschnittlich 1·00% Glykogen. Von den untersuchten Eiweißspaltungsprodukten hat Glykokoll unsichere, Leucin negative Resultate ergeben.

---

[1]) *Cremer*, Physiologie des Glykogens in Asher-Spiro, Ergebnisse der Physiologie. Bd. **1**. Biochemie. S. 803 (1900).

[2]) *Pflüger* und *Junkersdorf*, Über die Muttersubstanzen des Glykogens. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **131**. S. 218 (Tabelle) (1910).

Zur Untersuchung der Entstehung von Eiweiß im Körper ist diese Mastmethode nicht anwendbar, da eine Eiweißmästung überhaupt nicht oder nur in einem ganz geringen Grade möglich ist. Ob die geringen Mengen von Stickstoff, die im Körper zurückbehalten werden, wenn von einer eiweißarmen zu einer eiweißreichen Kost übergegangen wird, und die von *Voit* als Vermehrung des „zirkulierenden Eiweißes" gedeutet worden sind, wirklich als Eiweiß zurückbleiben, ist noch nicht erwiesen. Aber wenn es sich auch wirklich um Eiweiß handelt, so ist seine Menge zu klein, als daß eine quantitative Organuntersuchung sie nachweisen könnte. Sollte es sich aber um andere N-haltige Substanzen handeln, so wäre von weiteren chemischen Organuntersuchungen vielleicht eine Aufklärung zu erwarten.

B. Untersuchung normaler Körperflüssigkeiten (Blut, Chylus).

Im intakten Organismus ist eine chemische Untersuchung der Organe im allgemeinen nicht möglich, wenn auch gelegentlich einzelne Organstückchen dem lebenden Organismus entnommen und der Analyse unterworfen worden sind. (Z. B. Untersuchung auf Glykogen in Leberstückchen, die mittelst eines Troikarts entnommen waren.[1])

Ein einziges Organ ist ohne Gefährdung der Gesundheit auch beim Menschen einer genauen chemischen Untersuchung zugänglich: das Blut. Es kann ohne Schaden in Mengen bis zu etwa 300 *cm*³ durch Aderlaß oder besser durch Venaepunktion gewonnen werden. Nach Desinfektion der Haut der Ellbogenbeuge wird um den Oberarm eine Gummibinde so angelegt, daß die Venen sich stark füllen, der Radialpuls aber gut fühlbar bleibt. Dann wird eine nicht zu dünne Punktionsnadel durch die Haut flach in eine Cubitalvene eingestochen, das ausfließende Blut in einem Meßzylinder aufgefangen. Schröpfkopfblut ist zu chemischen Untersuchungen weniger geeignet.

Je nach der besonderen Art der Fragestellung wird das Gesamtblut oder das Blutserum oder das Blutplasma zur Untersuchung herangezogen. Das Blutserum scheidet sich beim einfachen Stehen des Blutes in einem hohen Gefäße (Meßzylinder) in der Kälte ab und kann abgegossen werden. Will man Plasma haben, so beschickt man den Meßzylinder, in dem das Blut aufgefangen werden soll, mit einer gerinnungshemmenden Substanz: entweder mit Hirudin (käuflich bei Sachsse & Cie. in Leipzig, teuer, mindestens 1 *mg* pro 100 *cm*³ Blut) oder mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung (ca. 35%ige Lösung des wasserhaltigen Salzes, ein Volumen auf 3 Vol. Blut) oder mit einer Lösung von neutralem Ammoniumoxalat oder Natriumoxalat oder Natriumzitrat oder Fluornatrium (von diesen Salzen auf je 100 *cm*³ Blut 10 *cm*³ einer 2—4%igen Lösung). Durch Rühren mit einem Glasstab ist schon während des Eingießens des Blutes für möglichst rasche Mischung zu sorgen. Beim Stehen, rascher beim Zentrifugieren, scheidet sich das Plasma ab. Ein Nachteil dieser Methoden besteht darin, daß das

[1]) *Frerichs,* Über den Diabetes. Berlin 1884. S. 272.

Blutplasma in nicht genau zu bestimmender Weise verdünnt wird. Will man quantitativ arbeiten, so müssen also die abgesetzten Blutkörperchen durch wiederholtes Waschen mit einer physiologischen Lösung und Abzentrifugieren gewaschen, die Waschwässer mit dem Plasma vereinigt werden.

Zur Kenntnis intermediärer Stoffwechselvorgänge haben Blutuntersuchungen bisher verhältnismäßig wenig beigetragen. Das liegt größtenteils daran, daß das Blut Zwischenprodukte des Abbaues nur in relativ geringer Menge enthält und daß es auch bei einseitiger Ernährung seine Zusammensetzung kaum ändert, solange die Nieren intakt sind.

Nur der Fettgehalt ist leicht beeinflußbar. Über die Bestimmungsmethoden siehe dieses Werk, Bd. V, S. 161. Der Gehalt des Blutserums an Neutralfett ist nicht nur nach reichlicher Aufnahme von Fett oder Fettsäuren vermehrt, sondern auch bei manchen anderen Zuständen, in denen dann ein gesteigerter Transport des Fettes aus den Fettdepots in andere Organe anzunehmen ist. (Hunger, schwerer Diabetes, Vergiftungen.)

Der Zuckergehalt des Blutes schwankt innerhalb viel engerer Grenzen: beim Menschen zwischen 0·08—0·12% im Gesamtblut; die Bestimmung muß sofort nach der Entnahme des Blutes angesetzt werden. Über die Methoden siehe Bd. V, S. 173. Nach reichlicher Zuckeraufnahme kann der Blutzuckerwert auch beim Gesunden ansteigen; doch sind solche Untersuchungen zur Feststellung der Muttersubstanzen der Kohlehydrate und ihrer Wanderung im gesunden Organismus bisher kaum herangezogen worden, um so mehr allerdings zur Aufklärung des Wesens der pathologischen Glykosurien.

Der Nachweis resp. die Bestimmung der anderen Blutbestandteile (Milchsäure, Glykokoll, Harnsäure, Oxalsäure usw.) hat für die Lehre vom intermediären Stoffwechsel bisher ebenfalls nur sehr wenig geleistet. Vor allem sind die Bestimmungsmethoden für diejenigen Stoffe noch ungenügend, die als Zwischenprodukte des Eiweißstoffwechsels im Blute vorkommen könnten. So ist es vielleicht zu erklären, daß es noch nicht gelungen ist, nach einer reichlichen Eiweißmahlzeit eine Veränderung der N-haltigen Bestandteile des Gesamtblutes nachzuweisen.

Abderhalden und seine Mitarbeiter[1]) haben die Untersuchung der Eiweißkörper des Blutes dazu benutzt, um etwas über den Ort zu erfahren, an welchem das Nahrungseiweiß zu Körpereiweiß umgebaut wird. Sie fanden, daß bei Ernährung mit einseitig zusammengesetztem, z. B. sehr glutaminsäurereichem Eiweiß (Gliadin) der Gehalt der Bluteiweißkörper an Glutaminsäure sich nicht wesentlich ändert; da dasselbe Resultat auch an Hunden mit *Eck*scher Fistel erhalten wurde, so darf geschlossen werden, daß der Aufbau des Körpereiweißes aus den resor-

[1]) *Abderhalden* und *Samuely*, Beiträge zur Frage nach der Assimilation des Nahrungseiweiß im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **46**. S. 193 (1905). — *Abderhalden, C. Funk* und *London*, Weiterer Beitrag zur Frage nach der Assimilation des Nahrungseiweiß im tierischen Organismus. Ebenda. Bd. **51**. S. 269 (1907).

bierten Aminosäuren wahrscheinlich schon in der Darmschleimhaut erfolgt. *Abderhalden* hebt hervor, daß die Methodik noch weiterer Ausbildung bedarf.

Man hat ferner versucht, die Stoffwechselfunktion eines bestimmten Organes dadurch festzulegen, daß man die Zusammensetzung des Blutes im zuführenden und im abführenden Gefäß miteinander verglich: z. B. den Zuckergehalt des Pfortaderblutes und des Lebervenenblutes. Von dem Vergleich des Blutes einer Extremitätenarterie mit dem einer Extremitätenvene könnte man Aufschlüsse über die chemischen Prozesse in der Muskulatur erwarten. Jedoch sind auch die Ergebnisse dieser Methodik weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben. Die in der Zeiteinheit durch die Organe strömende Blutmenge ist so groß, daß die Differenz in der Zusammensetzung des zufließenden und des abfließenden Blutes so gering wird, daß ihre Bestimmung in die Versuchsfehler der Methoden fällt.[1])

Nur der NH_3-Gehalt des Blutes scheint nach den Untersuchungen der *Nencki-Pawlow*schen Schule in verschiedenen Gefäßgebieten erhebliche Verschiedenheiten darzubieten.[2]) Die Bestimmung nach der Methode von *Nencki* und *Zaleski* ergab bei normalen Hunden:

	Im Hunger	In der Verdauungsperiode
	In 100 cm^3 Blut	
In der A. cruralis durchschnittlich . . .	0·42	0·41 *mg*
„ „ Pfortader	1·29	1·85 „
„ „ V. iliac. comm.	0·80	0·70 „

Diese Zahlen können so gedeutet werden, daß beim Abbau der Eiweißkörper resp. ihrer Spaltungsprodukte in der Darmschleimhaut NH_3 frei wird, das der Leber zugeführt und dort entweder zum Wiederaufbau von Eiweiß oder zur $\overset{+}{U}$-Bildung verwendet wird. Doch haben *Biedl* und *Winterberg*[3]) bei gleicher Versuchsanordnung sehr viel geringere Differenzen gefunden, denen sie keine entscheidende Bedeutung beizumessen vermögen (im Karotisblut 0·62, im Pfortaderblut 0·89 *mg*).

Über die Technik der Untersuchung „überlebenden Blutes“ siehe unten.

Aufschlüsse über die Funktion der Darmschleimhaut, speziell über die Fettsynthese in diesem Organ sind ferner durch Untersuchung des Chylus zu gewinnen. *J. Munk*[4]) hat großen Hunden von 20—38 *kg*, die

---

[1]) *Flügge*, Über den Nachweiß des Stoffwechsels in der Leber. Zeitschr. f. Biol. Bd. **13**. S. 133 (1877).

[2]) *Nencki* und *Zaleski*, Über die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **33**. S. 193 (1901). — *Horodynski, Salaskin* und *Zaleski*, Über die Verteilung des Ammoniaks im Blut und den Organen normaler und hungernder Hunde. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **35**. S. 246 (1902).

[3]) *Biedl* und *Winterberg*, Beiträge zur Lehre von der Ammoniak entgiftenden Funktion der Leber. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **88**. S. 140 (1902).

[4]) *J. Munk*, Zur Kenntnis der Bedeutung des Fettes und seiner Komponenten für den Stoffwechsel. *Virchows* Archiv. Bd. **80**. S. 10 (1880).

mindestens 36 Stunden lang gehungert hatten. 300 *g* mageres Pferdefleisch und in der durch Abkochen desselben mit 200 *cm*³ Wasser hergestellten Fleischbrühe die Fettsäuren von 100 *g* Fett verabreicht. 5 Stunden später in tiefer Morphiumnarkose den Ductus thoracicus am Hals freigelegt und unmittelbar vor seiner Einmündung in den Vereinigungswinkel der V. subclavia und V. jug. comm. sin. eine Glaskanüle eingebunden. „Die Operation ist, wofern man zunächst dem inneren Rande der Jugularis folgt und sich weiter unten an der hinteren Wand der Vene hält, nicht gerade schwer auszuführen. Man sieht dann über der oberen Brustappertur an der äußeren Seite der Karotis den Brustgang schief und zuweilen in einem Bogen nach vorne gegen den Vereinigungswinkel der V. jug. und V. subclavia ziehen, kann ihn hier in einer Länge von mehreren Zentimetern freilegen, unterbinden und eine Kanüle in ihn einführen. Wenn sich kurz vor seiner Einmündungsstelle der linke große Halslymphstamm in ihn ergießt, so wird dieser abgeklemmt. Man kann so, wenn nicht Gerinnungen eintreten, Chylus in reichlicher Menge gewinnen. Kleinere Gerinnsel in der Kanüle kann man meist durch vorsichtige Sondierung mit einer feinen Federfahne oder einem Draht entfernen" (vielleicht empfiehlt sich auch ein Betupfen der Kanüle mit etwas Hirudin). Der in der 6. und 7. Verdauungsstunde aufgefangene Chylus wurde gemessen und auf Fett, Fettsäuren und Seifen untersucht.

Ein aliquoter Teil der Menge wird mit Äther erschöpft.

<table>
<tr><td rowspan="2">Wässerige Lösung enthält die präformierten Seifen, wird mit Schwefelsäure angesäuert, mit Äther extrahiert, der Ätherrückstand im Vakuum getrocknet und als Fettsäure gewogen.</td><td colspan="2">Ätherextrakt wird abgedampft, Rückstand mit starker Sodalösung gekocht und dann mit Äther extrahiert.</td></tr>
<tr><td>Wässerige Lösung mit Schwefelsäure angesäuert, Fettsäuren extrahiert und gewogen.</td><td>Ätherisches Extrakt (Neutralfett und Cholesterin) getrocknet und gewogen. Durch Verseifung und Extraktion der Seifenlösung mit Äther kann das Cholesterin vom Fett getrennt werden.</td></tr>
</table>

	Ein Versuch an einem 38 *kg* schweren Hund ergab in der 6. Verdauungsstunde:	Ein Kontrollversuch bei einem 34 *kg* schweren Hund, der nur 300 *g* mageres Pferdefleisch erhalten hatte, in der 7. Verdauungsstunde:
Neutralfett	2·94 *g*	0·1[illegible] *g* (Neutralfett und freie Fettsäuren zusammen)
Freie Fettsäuren	0·415 *g*	
Fettsäure aus Seifen	0·175 *g*	0·1475 *g*

Dieser Versuch beweist, daß die verfütterten Fettsäuren auf dem Wege von der Darmhöhle bis zum Brustgang einer Synthese mit Glyzerin unterlegen sind.

Gelegentliche, allerdings recht seltene pathologische Vorkommnisse erlauben es, analoge Versuche auch am Menschen aufzuführen.

J. Munk und *Rosenstein*[1]) haben einen solchen Versuch bei einem Mädchen mit einer Chylusfistel am Unterschenkel angestellt. Die Patientin erhielt am vorhergehenden Tage fast fettfreie Nahrung (Brot und Bier), am Versuchstage 17 *g* nach *Reimer* und *Will* (Berichte d. Deutsch. chem. Ges. Bd. 19. S. 3320 [1887]) dargestellte Erukasäure in Oblaten, dann wieder bis zum nächsten Morgen fast fettfreie Nahrung. Die am Vortage klare Lymphe nahm von der 4. Stunde an chylöse Beschaffenheit an und enthielt nun Fett in einer Menge entsprechend 45% der gegebenen Erukasäure. Durch Bestimmung der *Meissl*schen Zahl erwies es sich als Neutralfett mit geringer Beimengung freier Fettsäuren, ohne Beimengung von Seifen. Der Nachweis der Erukasäure wurde in der oben S. 1157 angegebenen Weise geführt.

Gelegenheit zu derartigen Untersuchungen bieten ferner die Fälle von Chylurie. Der Umstand jedoch, daß der Chylus hier dem Urin beigemischt ist und die Menge des in den Harn übertretenden Chylus sehr starken Schwankungen unterworfen zu sein pflegt, beeinträchtigt hier die Einfachheit und Beweiskraft der Versuche. Die Menge des beigemischten Chylus kann nach dem Eiweißgehalt des Harnes geschätzt werden. (Der Eiweißgehalt des Chylus ist mit $3^1/_3$% anzunehmen.[2])

Auch an Kranken mit chylösem Aszites lassen sich derartige Untersuchungen ausführen.[3])

C. Untersuchung der Exkrete des normalen Organismus.

Bei der Untersuchung des intermediären Stoffwechsels am lebenden Organismus ist man im allgemeinen auf die Untersuchung der Ausscheidungen angewiesen, speziell auf die des Harns und der Ausatmungsluft.

Die Substanzen, die sich in den normalen Exkreten finden, sind allerdings in der Regel nicht als Zwischenprodukte, sondern als Endprodukte des Stoffwechsels anzusehen; doch gilt diese Regel keineswegs ausnahmslos. Bei allen in den Exkreten sich findenden Stoffen ist demnach zunächst die Frage aufzuwerfen, ob sie intermediäre Produkte sind oder Endprodukte. Die Entscheidung ergibt sich meist aus folgender Regel: Stoffwechsel-Endprodukte erscheinen, in den lebenden Organismus eingeführt, quantitativ oder nahezu quantitativ in

[1]) *J. Munk* und *Rosenstein,* Zur Lehre von der Resorption im Darm, nach Untersuchungen an einer Chylusfistel beim Menschen. *Virchows* Archiv. Bd. **123**. S. 239 (1891).

[2]) *Magnus-Levy,* Über europäische Chylurie. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **66**. S. 482 (1908).

[3]) *Minkowski,* Über die Synthese des Fettes aus Fettsäuren im Organismus des Menschen. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **21**. S. 373 (1886).

den Exkreten wieder; Zwischenprodukte erscheinen dagegen nicht oder nur zu einem gewissen Bruchteil im Harn wieder, sie vermehren aber die Menge eines oder mehrerer anderer Harnbestandteile.

1. Untersuchungen an Harnbestandteilen, die als Stoffwechselendprodukte anzusehen sind.

Endprodukte sind also dadurch charakterisiert, daß sie unverändert in den Harn übergehen, die Menge anderer Bestandteile aber nicht beeinflussen.

Ein Beispiel: *Verploegh*[1]) nahm während eines Selbstversuchs bei gleichmäßiger Kost an einem Tage 0·5 *g* Kreatinin in 3 Portionen. Die Kreatininausscheidung betrug 1·95 1·96 1·90 **2·35** **2·00** 1·93 1·91 *g* Kreatinin. Gegenüber dem Mittel aus der Vor- und Nachperiode (1·93 *g*) ist die Kreatininausscheidung am Versuchstage und am folgenden Tage um 0·49 *g* vermehrt. Das aufgenommene Kreatinin ist also quantitativ im Harn wieder erschienen.[2])

Das Kreatinin ist hier innerlich genommen worden. In manchen Fällen empfiehlt es sich aber, bei solchen Versuchen die Substanz subkutan oder intravenös zu verabfolgen, da bei Aufnahme per os leicht ein Teil unresorbiert bleibt oder im Darmkanal durch Bakterien zerstört werden kann. Zweifellos ist aber eine quantitative Ausscheidung nach stomachaler Darreichung, da diese mehr den natürlichen Verhältnissen entspricht, beweisender. Subkutane und intravenöse Injektion können unter Umständen wesentliche Störungen des Stoffwechsels verursachen.

Die quantitative Bestimmung solcher Endprodukte im Harn bei verschiedenartiger Ernährung gestattet in vielen Fällen einen Schluß darauf, aus welchen Muttersubstanzen sie hervorgehen.

Man gibt in der Vor- und Nachperiode eine konstante Kost, der man in der Hauptperiode das zu prüfende Nahrungsmittel in möglichst reiner Form zulegt; die Ausscheidung der Endprodukte im Harn wird verfolgt. Vermehrung eines Harnbestandteiles wird schließen lassen, daß er aus der zugeführten Substanz hervorgegangen ist. Es kann übrigens auch das umgekehrte Verfahren eingeschlagen werden: Weglassung oder Einschränkung eines Nahrungsstoffes in der Hauptperiode. In beiden Fällen wird man die äußeren Bedingungen möglichst gleichmäßig gestalten (z. B. Vermeidung von Muskelanstrengungen).

---

[1]) *Hoogenhuyze* und *Verploegh*, Beobachtungen über die Kreatininausscheidungen beim Menschen. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **57**. S. 201 (1908).

[2]) Ein weiteres Beispiel bieten Versuche über die Rolle des Allantoins im Stoffwechsel des Hundes. *Poduschka*, Quantitative Versuche über Allantoinausscheidung. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **44**. S. 64 (1900). *Wiechowski*, Die Bedeutung des Allantoins im Harnsäurestoffwechsel. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. **11**. S. 109 (1907). Ein mit verläßlichen Methoden durchgeführter Versuch, der die quantitativ unveränderte Ausscheidung eingeführten Harnstoffs beweist, scheint in der Literatur nicht zu existieren.

Diese Methode wird freilich nur in dem Falle Aufschluß bringen können, wenn die Zersetzung der Körpersubstanz keine feststehende Größe ist, sondern von der mit der Nahrung zugeführten Menge abhängig ist. Das trifft nicht für alle, aber doch für manche Nahrungsstoffe zu, speziell für die N-haltigen.

Besonders die Größe des Eiweißumsatzes wird in erster Linie von der Quantität des zugeführten Eiweißes bestimmt *(C. Voit)*; deswegen ist es so einfach, den exakten Nachweis zu führen, daß der Harnstoff des Harns aus den Eiweißkörpern entsteht, die Harnsäure dagegen andere Muttersubstanzen haben muß.

Die Menge der vom Menschen ausgeschiedenen Harnsäure steigt nach Zufuhr von zellkernreicher Nahrung, von Nukleinsäure und von reinen Purinbasen bedeutend an[1]), sie nimmt bei Aufnahme einer zellkernarmen Kost sehr beträchtlich ab. Diese Beobachtungen beweisen, daß die Stoffe der Zellkerne als Muttersubstanzen der Harnsäure anzusehen sind, während die Basen wahrscheinlich als Zwischenprodukte gelten dürfen. Beim Tier (Hund, Kaninchen, Schwein) erweisen ähnlich angelegte Versuche das Allantoin als Endprodukt des Nukleinstoffwechsels. Beispiel[2]): Ein gleichmäßig gefütterter Hund erhält an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 8 *g* thymonukleinsaures Natron mit einem Purin-N-Gehalt von 0·41 *g* per os. Es ergibt sich:

Mittel aus 5 Vortagen	0·0017 PBN,	0·0021 UN,	0·114 All-N,	0·1178 (Summe)
Mittel aus 3 Versuchstagen	0·0095 „	0·0153 „	0·512 „	**0·5368** „
Mittel aus 2 Nachtagen	0·0020 „	0·0019 „	0·115 „	0·1189 „

Der Basen-N des nukleinsauren Natrons ist also quantitativ (rechnungsmäßig zu 102%) im Harn wieder erschienen, und zwar:

zu 2% in Form von Basen,
zu 3% in Form von Ū,
zu 95% in Form von Allantoin.

Diese Methode, die Muttersubstanzen der Harnbestandteile festzustellen, ist jedoch durchaus nicht immer anwendbar.

a) Die Größe der Ausscheidung mancher Endprodukte ist im wesentlichen unabhängig von der Art der Nahrung. So wird vor allem die Verbrennung der Kohlenhydrate und noch mehr die der Fette nicht von der Zufuhr dieser Substanzen bestimmt. Werden sie im Überschuß zugeführt, so wird nicht wesentlich mehr zersetzt, sondern der Überschuß wird als Reservestoff abgelagert. Unabhängig von der Nahrungszufuhr ist ferner die Ausscheidung des Kreatinins im Harn, vielleicht auch die Ausscheidung des neutralen Schwefels.

[1]) *Weintraud,* Über Harnsäurebildung beim Menschen. Archiv f. Anatomie und Phys. Abt. f. Physiol. (1895). S. 382.

[2]) *Schittenhelm,* Über die Umsetzung verfütterter Nukleinsäure beim Hund. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **62**. S. 86 (1909).

b) Auch die Ausscheidungsprodukte, deren Menge sich im allgemeinen als abhängig erweist von der Art und Menge der Nahrung, brauchen nicht völlig aus dem Harn zu verschwinden, wenn ihre Muttersubstanz dem Körper nicht mehr zugeführt wird. So wird auch bei eiweißfreier Kost immer Harnstoff ausgeschieden. Auch die Ausscheidung der Harnsäure und der Purinbasen sinkt bei nukleinfreier Kost nicht bis auf 0 herab. In beiden Fällen wird das Bildungsmaterial offenbar dem Bestande der Gewebe entnommen.

Es ist unter Anderen von *Folin*[1]) die Anschauung vertreten worden, daß diese von der Kost nicht beeinflußbaren Reste der Ausscheidungsprodukte ebenso wie die von der Ernährung überhaupt unabhängigen Stoffe (Kreatinin, neutraler Schwefel) als Ausdruck des Stoffwechsels der Gewebe (des „endogenen Metabolismus") zu betrachten sind.

c) Unter Umständen können Änderungen der Ernährung indirekt die Menge gewisser Ausscheidungsprodukte beeinflussen. Es sei hier nur an die sparende Wirkung der Kohlenhydrate und Fette auf die Eiweißzersetzung hingewiesen.

d) Täuschungen können auch durch die im Darm vor sich gehenden Zersetzungsprozesse veranlaßt werden: einerseits in der Weise, daß ein Teil des zugeführten Stoffes zerstört wird; andrerseits so, daß die Produkte der Darmfäulnis zum Teil resorbiert werden und dann unverändert mehr weniger verändert in den Harn übertreten. Daß ein Harnbestandteil als Produkt der Darmfäulnis, nicht als Stoffwechselprodukt des Körpers selbst zu deuten ist, darf man annehmen, wenn seine Menge mit dem Grade der Darmfäulnis wechselt, wenn sie bei notorisch starker Darmfäulnis (wie sie z. B. pathologische Zustände darbieten) bedeutend zunimmt, bei Abnahme der Darmfäulnis geringer wird oder ganz verschwindet. Eine verminderte Darmfäulnis findet man häufig bei Diarrhöen. Man hat auch versucht, die Darmfäulnis experimentell durch innerliche Anwendung von desinfizierenden Mitteln herabzusetzen, jedoch mit sehr geringem Erfolg.[2]) Diese Mittel wirken in der Regel nur dann, wenn sie Diarrhöen herbeiführen. *Baumann*[3]) verfuhr so, daß er einen Hund am 2. und 4. Hungertag je 2 *g* Kalomel gab, so daß Diarrhöen eintraten. Der Harn des 5. und 6. Tages war frei von Indoxyl, Ätherschwefelsäuren und Hippursäure; diese Stoffe entstammen demnach beim Fleischfresser ausschließlich der Darmfäulnis; die aromatischen Oxysäuren waren an Menge vermindert; sie dürften demnach nur zum Teil auf die Darmfäulnis zurückzuführen sein; die Kynurensäure wurde nicht beeinflußt, ist also als echtes Stoffwechselprodukt anzusprechen. Die Beeinflussung der Darm-

[1]) *O. Folin*, A Theory of Protein Metabolism. American Journ. of Physiol. Bd. 13. S. 117 (1905).

[2]) *D. Gerhardt*, Über Darmfäulnis. Ergebnisse der Physiologie. Jg. 3. Abt. Biochemie. S. 153 (1904).

[3]) *Baumann*, Die aromatischen Verbindungen im Harn und Darmfäulnis. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. 10. S. 129 (1885).

fäulnis durch Änderung der Kost ist recht unsicher. Sehr gering ist die Darmfäulnis bei Säuglingen. Man könnte erwarten, daß sich im Harn von Neugeborenen Fäulnisprodukte überhaupt nicht vorfinden; trotzdem hat man solche gefunden; sie entstammen offenbar den bakteriellen Zersetzungen im Verdauungskanal der Mutter.

Um die Darmfäulnis sicher auszuschalten, haben *Nuttal* und *Thierfelder*[1]) Tiere von vornherein steril aufgezogen. Das Verfahren besteht im wesentlichen darin, daß reife Meerschweinchenembryonen unter sterilen Kautelen durch Kaiserschnitt gewonnen und unter einer Glocke mit steriler Milch ernährt werden. Nach Beendigung des Versuches ist die Sterilität des Darmtraktes bakteriologisch zu kontrollieren. Die beiden Autoren konnten so zeigen, daß der Harn frei von Phenol, Kresol, Indol, Skatol, Brenzkatechin war, daß er aber aromatische Oxysäuren enthielt.

2. Untersuchungen an Zwischenprodukten des Stoffwechsels, die im normalen Harn vorkommen.

Daß eine im Harn ausgeschiedene Substanz als intermediäres Stoffwechselprodukt anzusehen ist, muß dann angenommen werden, wenn sie, in den Organismus eingeführt, nur zu einem beschränkten Teil oder gar nicht im Harn wieder erscheint, dagegen die Menge eines anderen Harnbestandteiles vermehrt. Dieser vermehrte Harnbestandteil ist dann als weiteres Abbauprodukt anzusehen.

Beispiel[2]):

Eine Versuchsperson erhält bei gleichmäßiger purinfreier Kost an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 1·5 *g* Hypoxanthin (entsprechend zweimal 0·618 *g* N).

Im Harn wurde bestimmt	Vorperiode			Versuchsperiode		Nachperiode			
der Basen-N . .	0·0138	0·0134	0·0162	0·0163	0·0184	0·0155	0·0131	0·0131	0·0150
der $\overline{\text{U}}$-N	0·155	0·138	0·160	0·327	0·541	0·317	0·198	0·156	0·146

Gegenüber dem Mittel der Vor- und den beiden letzten Tagen der Nachperiode von

0·0141 *g* Basen-N 0·151 *g* $\overline{\text{U}}$-N

betrug die Mehrausscheidung:

am 1. Versuchstag	0·0022 *g* Basen-N,	0·176 *g*	$\overline{\text{U}}$-N
„ 2. „	0·0043 *g* „	0·390 *g*	„
„ 1. Nachtag	0·0014 *g* „	0·166 *g*	„
„ 2. „	— „	0·047 *g*	„
Summe der Mehrausscheidung . .	0·0079 *g* Basen-N,	0·779 *g*	U-N

[1]) *Nuttal* und *Thierfelder,* Tierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **21**. S. 109 (1895); Bd. **22**. S. 62 (1896) (genaue Beschreibung der Versuchsanordnung).

[2]) *Krüger* und *Schmidt,* Die Entstehung der Harnsäure aus freien Purinbasen Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **36**. S. 558 (1902).

also neben einer unbedeutenden Vermehrung des Purinbasen-N eine sehr erhebliche Vermehrung des U-N. Demnach ist Hypoxanthin kein Stoffwechselendprodukt.

Die Frage nach den Muttersubstanzen derartiger im Harne vorkommender Zwischenprodukte läßt sich in vielen Fällen in ähnlicher Weise entscheiden, wie das für die im Urin vorhandenen Endprodukte oben angegeben worden ist. Doch gibt hier die Verfütterung der mutmaßlichen Muttersubstanz häufig keine so klar überzeugenden Resultate, da der größte Teil bis zum Endprodukt abgebaut wird. Siehe z. B. die geringe Steigerung der Purinbasen- und Harnsäureausscheidung nach Verabreichung von Nukleinsäure an einen Hund (S. 1172). Die Hauptsteigerung betrifft das Endprodukt, das Allantoin.

Bei solchen im normalen Harn erscheinenden, intermediären Produkten wird man sich ferner eine Vorstellung darüber bilden müssen, warum der Abbau zu dem Endprodukt nicht vollständig erfolgt, warum z. B. nicht der gesamte Basenstickstoff der gegebenen Nukleinsäure (in Versuch S. 1172) als Allantoin ausgeschieden wird, sondern immer ein Teil der vollständigen Umwandlung entgeht. Man wird dabei an folgende Möglichkeiten zu denken haben:

a) Das unvollständig veränderte Produkt hat noch eine besondere Funktion zu erfüllen: z. B. das NH_3 als Neutralisationsmittel für auszuscheidende Säuren. In diesem Falle wurde diese Deutung so bewiesen, daß die Funktion durch Alkalidarreichung anderweitig versehen wird. Tatsächlich sinkt dann die NH_3-Ausscheidung im Harn bis auf Spuren, z. B. 0·0086 *g* NH_3-N (*Janney*).

b) Daß die abbauenden Kräfte des Organismus nicht genügen, respektive daß die Zeit zur völligen Veränderung nicht ausreicht. In diesem Falle wird man erwarten dürfen, daß diese Insuffizienz bei Stellung gesteigerter Anforderungen noch stärker hervortritt, daß dann also ein relativ größerer Anteil als intermediäres Produkt ausgeschieden wird.

Für die Ausscheidung der Purinbasen im normalen Harn trifft das z. B. nicht zu; wenn man einer purinfreien Kost nukleinreiche Nahrungsmittel zulegt, so steigt die Menge der Purinbasen im Harn in viel geringerem Grade als die der Harnsäure.

c) Daß ein intermediäres Produkt in verschiedenen Organen entsteht, aber nur in einem bestimmten Organ zu seinem Endprodukt abgebaut wird. Auf dem Transport von dem Entstehungsorte zum Abbauorgan durch das zirkulierende Blut wird ein Teil der unvollständig zersetzten Substanz in die Niere kommen und kann dort als harnfähiger Stoff in den Harn übertreten.[1]

d) Die Stoffwechselprodukte der Niere selbst werden vielleicht, ohne daß sie Gelegenheit haben, in einem anderen Organe vollständig abgebaut zu werden, in den Harn ausgeschieden.

e) Man kann sich vorstellen, daß ein unvollständig verändertes Produkt neben dem Endprodukt aus dem Grunde in den Sekreten erscheint, weil seine Umwandlung in das Endprodukt eine „umkehrbare Reaktion" ist, die einem bestimmten Gleichgewichtszustand zustrebt.[2] Ob diese Auffassung bei normalen Harnbestandteilen tatsächlich zu Recht besteht, ist zweifelhaft. Für die pathologische Azetonkörperaus-

---

[1]) *Magnus-Levy*, Physiologie des Stoffwechsels in v. Noorden, Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels. Bd. 1. S. 11 (1907).

[2]) *O. Neubauer*, Ein Beitrag zur Kenntnis der diabetischen Azidose. Verhandl. des 27. Kongresses f. innere Medizin. S. 566 (1910). — *Lichtwitz*, Über chemische Gleichgewichte im Stoffwechsel. Verhandl. d. 28. Kongresses f. innere Medizin. S. 534 (1911). — *O. Neubauer*, ebenda. Diskussionsbemerkung S. 488 und 534. — *Lichtwitz*, ebenda. Diskussionsbemerkung S. 487.

scheidung trifft sie wahrscheinlich zu. In speziellem Fall können folgende Beweisgründe für sie beigebracht werden:

1. Der Nachweis, daß beide Substanzen für gewöhnlich in einem annähernd konstanten, relativen Mengenverhältnis im Harn erscheinen;

2. der Nachweis, daß nicht nur nach Einführung der intermediären Substanz das Endprodukt an Menge zunimmt, sondern auch umgekehrt Darreichung des Endproduktes, Vermehrung des intermediären Produktes zur Folge hat;

3. der Nachweis dieser Umkehrbarkeit an isolierten Organen.

Für den Fall der Azetonkörper haben sich diese Beweisgründe beibringen lassen (s. unten).

3. Methoden, welche auf der Kontrolle der N-Bilanz beruhen.

Da neben den Eiweißkörpern und ihren Abbauprodukten andere N-haltige Substanzen im Organismus quantitativ nur eine geringe Rolle spielen, so erlaubt die Verfolgung der N-Einnahme und -Ausgabe wichtige Schlüsse auf den Eiweißstoffwechsel. Über die Technik solcher Eiweißstoffwechselversuche siehe dieses Werk Bd. III, S. 1005.

Bekanntlich setzt sich jedes normale, nicht wachsende Tier, das mit einer gleichmäßigen ausreichenden, vor allem nicht zu eiweißarmen Nahrung gefüttert wird, innerhalb einiger Tage ins N-Gleichgewicht, d. h. der N der Sekrete (Urin und Kot) ist gleich dem N der eingeführten Nahrung. Steigert man dann die Eiweißmenge in der Nahrung, so bleibt zunächst die N-Ausfuhr hinter der Einfuhr zurück (positive N-Bilanz), bis nach einigen Tagen wieder N-Gleichgewicht eintritt. Umgekehrt verhält es sich, wenn man die Mengen des Nahrungseiweißes herabsetzt (negative N-Bilanz, dann wiederum N-Gleichgewicht). Geht die Eiweißzufuhr aber unter ein gewisses Minimum herunter, so vermag sich der Körper nicht mehr ins N-Gleichgewicht einzustellen, sondern die N-Bilanz bleibt dauernd negativ. Dieses Verhalten gibt ein Mittel an die Hand, um zu untersuchen, ob dem gewöhnlichen Nahrungseiweiß nahestehende Substanzen als vollständiger Ersatz für dieses eintreten könnten.

O. Löwi[1]) hat auf Grundlage dieses Verhaltens eine Versuchsanordnung geschaffen, die es ermöglicht, den synthetischen Aufbau von Eiweiß aus seinen Bausteinen nachzuweisen. Es gelang ihm, mit verdautem, keine Biuretreaktion mehr gebendem Pankreas Hunde nicht nur im N-Gleichgewicht zu halten, sondern sogar zum N-Ansatz zu bringen. Die Versuchstechnik ist seither besonders durch die Bemühungen *Abderhaldens* bedeutend verbessert worden.

Als Versuchsobjekte dienen am besten Hunde. Sie erhalten nach einer Hungerperiode zunächst ein gleichmäßiges, aus Fleisch, Fett und Kohlehydraten bestehendes, zur Erhaltung des N-Gleichgewichtes eben ausreichendes Futter (statt dessen kann man den Versuch auch unmittelbar nach einer Hungerperiode beginnen).

[1]) *Otto Löwi*, Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 48. S. 303 (1902).

In der eigentlichen Versuchsperiode wird das Fleisch durch möglichst weit aufgespaltenes Eiweiß ersetzt. Am besten gibt man dieses in Form fermentativ aufgespaltenen Fleisches. Möglichst fettfreies Pferdefleisch wird 6 Wochen lang mit Hundemagensaft verdaut, dann die Reaktion durch Zusatz von $NaHCO_3$ leicht alkalisch gemacht und nunmehr Pankreassaft, eventuell auch Pankreatin (Rhenania), zugegeben. Nach 14 Tagen setzt man noch ein Extrakt aus Darmschleimhaut hinzu, bricht nach weiteren 4 Wochen die Verdauung ab und filtriert.[1] Erfahrungsgemäß genügt diese Behandlung zur beinahe völligen Aufspaltung. Um aber zu sicheren Versuchsresultaten zu kommen, ist es nach *Abderhalden* durchaus notwendig, in jedem Falle durch genaue Untersuchung des Verdauungsproduktes festzustellen, daß es wirklich vollständig oder doch nahezu vollständig aufgespalten ist. Fehlen der Biuretreaktion allein beweist das noch nicht. Kompliziertere Produkte (Polypeptide) dürfen nur in so geringer Menge vorhanden sein, daß sie zur Aufrechterhaltung des N-Gleichgewichtes keinesfalls ausreichen können.

Die Kontrolle des Verdauungsproduktes geschieht am einfachsten durch die Formoltitrationsmethode von *Sörensen*[2]; man untersucht, ob die Menge der Aminosäuren in dem Verdauungsprodukt beim Kochen mit Salzsäure noch zunimmt.

5 *g* des trockenen Präparates werden in 100 cm^3 Wasser gelöst.

a) In 5 cm^3 dieser Lösung wird der N-Gehalt nach *Kjeldahl* bestimmt.

b) 25 cm^3 derselben Lösung werden gegen Lackmuspapier möglichst genau neutralisiert und auf 200 cm^3 verdünnt. In 40 cm^3 dieser Lösung wird NH_3 nach *Krüger-Reich-Schittenhelm* bestimmt, andere 40 cm^3 zur Formoltitrierung benutzt und so die Menge des Aminosäuren-N und NH_3-N bestimmt.

c) Weitere 25 cm^3 werden durch 6 Stunden langes Kochen mit 25 cm^3 konzentrierter Salzsäure hydrolysiert, die dunkelbraune Flüssigkeit auf dem Wasserbade bis zur Trockene eingedampft; der Rückstand wird mit Wasser in einen 100 cm^3 Meßkolben gebracht, mit $AgNO_3$ entfärbt, auf 100 cm^3 aufgefüllt und filtriert. Vom Filtrat werden 50 cm^3 in einem 100 cm^3-Kolben genau gegen Lackmuspapier neutralisiert und bis zur Marke verdünnt. Von dieser Lösung werden wieder 40 cm^3 zur NH_3-Bestimmung, 40 cm^3 zur Formoltitrierung verwendet.

Die Menge des Aminosäuren-N muß bei *b)* und *c)* annähernd gleiche Werte ergeben.

[1] *Abderhalden* und *Olinger*, Weiterer Beitrag zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im tierischen Organismus. 7. Mitteilung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **57**. S. 74 (1908).

[2] *Henriques* und *Gjaldbäk*, Über quantitative Bestimmung der im Protein oder in dessen Abbauprodukten vorhandenen peptischen Bindungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **67**. S. 8 (1910). — *Abderhalden* und *Kona*, Weiterer Beitrag etc. 15. Mitt. Zeitschrift für physiol. Chemie. Bd. **67**. S. 405 (1910).

Die komplizierten Prüfungsmethoden, die *Abderhalden*[1]) in seinen älteren Versuchen zur Kontrolle verwendete, sind durch die Formoltitrationsmethode wohl entbehrlich geworden.

Zur Verfütterung wird das Verdauungsprodukt in feste Form übergeführt, indem man es unter vermindertem Druck bei 40° bis zur Trockene eindampft. (Bei höherer Temperatur würde das Tryptophan zersetzt werden!) Gegenwärtig bringen die Höchster Farbwerke *Meister, Lucius* und *Brüning* ein solches nach den Angaben von *Abderhalden* dargestelltes, leicht wasserlösliches Produkt unter dem Namen „Erepton" in den Handel, das durch sukzessive Einwirkung von Magensaft, Pankreassaft und Darmsaft auf ganz mageres Rindfleisch gewonnen ist. Es ist vollständig gespalten und enthält nur 0·5% Fett.

Die Hunde pflegen dieses abgebaute Fleisch, besonders wenn es mit Stärke und Fett gereicht wird, gut zu vertragen. (In einem Experiment, in dem Kohlenhydrate und Fett weggelassen wurde, hat *Abderhalden* 5 *g* Knochenasche pro Tag zugesetzt.) In der Regel bleiben die Tiere ganz munter, Verdauungsstörungen (Erbrechen, Diarrhöen) können vollständig fehlen. Sie treten besonders dann ein, wenn der Abbau der Proteine ein unvollständiger war, oder wenn sich weitergehende Zersetzungsprodukte gebildet haben. Tiere, die zum Erbrechen neigen, scheidet man natürlich möglichst von den Versuchen aus.

Mit dem aufgespaltenen Eiweiß wird das Tier möglichst lange Zeit (einige Wochen) gefüttert und die N-Bilanz beobachtet. Erhaltenbleiben des N-Gleichgewichtes durch längere Zeit beweist, daß der Organismus imstande ist, Eiweiß aus den Bausteinen aufzubauen. Noch beweisender sind Versuche, in welchen N-Ansatz mit gleichzeitiger Zunahme des Körpergewichts erzielt wird, was am ausgiebigsten bei wachsenden Tieren gelingt. Als Beispiel diene einer der zahlreichen Versuche *Abderhaldens*[2]): Ein Hund von 7450 *g* erhält durch 7 Tage 27 *g* verdautes Fleisch (gleich 2·9 *g* N), 45 *g* Fett, 30 *g* Stärke und 20 *g* Zucker; dann durch weitere 25 Tage 27 *g* verdautes Fleisch, 70 *g* Fett. Er retiniert während dieser 32 Tage 14·38 *g* N, sein Körpergewicht steigt auf 8370 *g*.

Statt des verdauten Fleisches kann man auch autolysiertes Pankreas[3]) verwenden oder Kasein[4]), das durch kombinierte Verdauung mit Pepsin-HCl, Pankreatin und Darmextrakt aufgespalten ist. Kasein hat

[1]) *Abderhalden* und *Olinger,* Weiterer Beitrag etc. 7. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 57. S. 74 (1908).

[2]) *Abderhalden, Messner* und *Windrath,* Über die Verwertung etc. 9. Mitt. Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. 59. S. 41 (1909).

[3]) *O. Löwi,* Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 48. S. 303 (1902). — *Henriques,* Die Eiweißsynthese im tierischen Organismus. Zeitschrift für physiol. Chem. Bd. 54. S. 406 (1908).

[4]) *Abderhalden* und *Rona,* Über die Verwertung der Abbauprodukte des Kaseins im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 44. S. 198 (1905). — *Abderhalden* und *Olinger,* Weiterer Beitrag etc. 7. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 57. S. 74 (1908).

gegenüber dem Fleisch den Vorteil, ein reiner Eiweißkörper zu sein; doch ist in diesen Versuchen ein wesentlicher N-Ansatz nicht zu erwarten, da ein solcher auch mit ungespaltenem Kasein kaum zu erreichen ist.

Auch durch Säure hydrolysierte Eiweißkörper können Verwendung finden, z. B. durch Säure hydrolysiertes Fleisch.[1]) Fein zerhacktes Pferdefleisch wird eine Woche lang mit 10%iger Schwefelsäure und zum Schluß 2 Stunden lang mit 25%iger Schwefelsäure auf 100° (Wasserbad) erhitzt. Die Schwefelsäure wird durch Baryt entfernt. Geringe Mengen von Baryt bleiben leicht in Lösung; um sie zu entfernen, bestimmt man den noch vorhandenen Ba-Gehalt nach Veraschung einer Probe und setzt dann zu dem Gemisch die entsprechende Menge Schwefelsäure. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Vor der Verfütterung wird, da das Tryptophan bei der Hydrolyse mit Säure verändert wird, noch 0·5% Tryptophan zugesetzt.

Henriques und *Hansen*[2, 3]) gelang es in ähnlichen Versuchen, an weißen Ratten N-Anlagerungen zu erzielen. Die Tiere wurden in einem eigens konstruierten Stoffwechselkäfig[2]) gehalten. Sie erhielten Pankreas, das mit Trypsin und Erepsin verdaut und dann noch 6 Stunden lang mit 20%iger Schwefelsäure gekocht worden war. (Die Tryptophanreaktion war noch positiv.) Das pulverisierte und getrocknete Material wurde mit Zucker, anorganischen Salzen (NaCl, KCl, kohlensaures Natron und Knochenasche) und fein verteilter Zellulosemasse vermischt, die Mischung mit Schweinefett verrührt, bis das Ganze erstarrte und eine völlig gleichartige Masse bildete. Ratten als Versuchsobjekte bieten zwar den Vorteil, daß man mit geringen Nahrungsmengen auskommt, sind aber deswegen weniger geeignet als Hunde, weil bei so geringen N-Ausscheidungen die Fehler der Methoden besonders schwer ins Gewicht fallen (*Abderhalden*).

Auch am Menschen lassen sich solche Versuche anstellen. So liegt ein Versuch vor, in welchem es gelang, bei einer Versuchsperson während 15 Tagen zum größten Teil vom Rektum aus mit völlig abgebautem Fleisch eine bedeutende N-Retention herbeizuführen und das Körpergewicht zu heben.[4])

Durch diese Versuche läßt sich also die Eiweißsynthese aus den einfachen Bausteinen beweisen. Einzelne negative Versuche besagen wenig. Sie können dadurch erklärt werden, daß die Aminosäuren durch

[1]) *Abderhalden*, Weiterer Beitrag etc. 8. Mitt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **57**. S. 348 (1908). — *Abderhalden* und *Oskar Frank*, Weiterer Beitrag etc. 12. Mitt. Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. **64**. S. 158 (1909).

[2]) *Henriques* und *Hansen*, Über Eiweißsynthese im Tierkörper. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **43**. S. 417 (1905).

[3]) *Henriques* und *Hansen*, Weitere Untersuchungen über Eiweißsynthese im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **48**. S. 113 (1906). — *Henriques*, Die Eiweißsynthese im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **54**. S. 406 (1908).

[4]) *Abderhalden*, *Franz*, *Frank* und *Schittenhelm*, Über die Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im menschlichen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **62**. S. 215 (1909).

die Vorbehandlung weitergehend verändert worden sind. Es ist kaum daran zu zweifeln, daß es schließlich auch gelingen wird, durch ein Gemisch rein dargestellter Aminosäuren und Diaminosäuren N-Gleichgewicht und N-Ansatz zu erzielen.

Die Untersuchung der N-Bilanz erlaubt ferner die Beantwortung der Frage, ob der Organismus imstande ist, einzelne Aminosäuren in genügender Menge synthetisch aufzubauen. Wenn sich zeigen ließe, daß ein Eiweißkörper, dem einzelne Bausteine der gewöhnlichen Eiweißkörper fehlen, imstande ist, den Körper durch längere Zeit im N-Gleichgewicht zu erhalten, so müßte man schließen, daß der Organismus den fehlenden Baustein selbst produziert hat (durch Synthese); nur bei einigen wenigen Aminosäuren: Glykokoll, Alanin, Serin, Asparaginsäure, Tyrosin, Phenylalanin und Oxyprolin wäre eine einfache direkte Entstehung aus anderen Aminosäuren denkbar. Als derartige „unvollkommene" Eiweißkörper stehen zur Verfügung:

Leim (es fehlen Tyrosin, Tryptophan, Cystin).

Gliadin (es fehlt Lysin).

Zein (es fehlen Tryptophan, Lysin, Glykokoll, Oxyprolin).

Seide (sehr geringer Leuzingehalt).

In jedem einzelnen Fall ist der zu verfütternde Eiweißkörper vor dem Versuch auf seine Reinheit respektive auf das Fehlen des betreffenden Bausteines zu prüfen. Bis jetzt sind alle Versuche, das Nahrungseiweiß durch solche „unvollkommene" Eiweißkörper völlig zu ersetzen, negativ ausgefallen, so daß also eine ausgiebige Synthese von Aminosäuren (mit Ausnahme des Glykokolls und vielleicht des Alanins) unwahrscheinlich erscheint. Der Einwand, daß die Ergebnisse dieser Versuche vielleicht auf der großen Widerstandsfähigkeit dieser Eiweißkörper gegen die Fermente des Verdauungstraktes beruhen könnten, kann dadurch ausgeschaltet werden, daß man nach dem Vorschlage *Abderhaldens* an Stelle der Eiweißkörper die Summe ihrer Spaltungsprodukte verfüttert. Völlig gesichert würde das Versuchsergebnis weiter dadurch, daß Zulage der fehlenden respektive in ungenügender Menge vorhandenen Bausteine den aufgespaltenen unvollkommenen Eiweißkörper dem Nahrungseiweiß gleichwertig machen müßte. Doch ist dieser Beweis bisher noch in keinem Falle völlig gelungen.[1])

Statt zu solchen Versuchen natürliche „unvollkommene" Eiweißkörper zu verwenden, kann man auch einen Eiweißkörper, der alle Bausteine enthält, hydrolytisch aufspalten und einen einzelnen Baustein aus dem Gemisch der Spaltungsprodukte entfernen. So kann man aus dem Verdauungsgemisch des Kaseins die Hauptmenge des Tryptophans durch Fällung mit

---

[1]) *Rona* und *Müller*, Über den Ersatz von Eiweiß durch Leim. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **50**. S. 263 (1907). — *Abderhalden* und *Manoliu*, Weiterer Beitrag etc. 14. Mitt. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **65**. S. 336 (1910).

Hg-Sulfat in schwefelsaurer Lösung ausfällen; aus dem Filtrat wird die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt, das Hg mit H_2S entfernt, H_2S durch einen Luftstrom vertrieben. Die wirklich quantitative Entfernung dieser giftig wirkenden Stoffe ist unbedingt nötig. Als Kontrolle dient ein Versuch mit dem vollständigen Verdauungsprodukt von Kasein und ein Versuch mit Entfernung und nachträglichem Wiederzusatz von Tryptophan. Es ist bisher noch nicht geglückt, diese 3 Versuche an demselben Tier auszuführen; doch geht auch aus den bisher vorliegenden Versuchen hervor, daß ohne Tryptophanzufuhr das N-Gleichgewicht nicht erhalten werden kann.[1])

Eine analoge Versuchsanordnung wird auch die Entscheidung der Frage ermöglichen, ob der Körper imstande ist, die Aminosäuren der Eiweißkörper aus nahestehenden N-freien Stoffen, etwa aus den entsprechenden Ketonsäuren oder Oxysäuren, in genügender Menge aufzubauen.

4. Methoden, welche auf der Kontrolle der C-Bilanz beruhen.

Ähnlich wie eine längere Zeit andauernde, mit Körpergewichtszunahme einhergehende Retention von N als Zeichen eines Eiweißansatzes gedeutet werden kann, wird man auch bei einer ausgiebigen Retention von C (ohne entsprechende gleichzeitige Retention von N) auf den Ansatz von Glykogen oder Fett schließen dürfen. Da nun Glykogen erfahrungsgemäß nur in beschränkter Menge aufgestapelt werden kann, so können wirklich bedeutende C-Retentionen als Zeichen eines Fettansatzes gelten. Diesen Gedankengang hat die *Pettenkofer-Voit*sche Schule benutzt, um die Entstehung von Fett aus Eiweiß darzutun.[2]) Die älteren Versuche sind an Hunden ausgeführt, die sich bei Fütterung mit großen Mengen mageren Pferdefleisches im N-Gleichgewicht befanden. Außer der Kontrolle des N-Gleichgewichtes durch Bestimmung der N-Einnahmen (Analyse des Fleisches) und Ausgaben (Analyse von Harn und Kot) ist zur Aufstellung der C-Bilanz festzustellen:

1. Die Menge des eingeführten C, und zwar nur die Menge des in der Form von Eiweiß eingeführten C. Von dem C-Gehalt des Fleisches ist also der C-Gehalt des im Fleisch noch vorhandenen Fettes und Glykogens abzuziehen. Diese C-Einfuhr wurde in den Versuchen nicht jedesmal direkt bestimmt, sondern aus dem N-Gehalt durch Multiplikation mit dem Faktor 3·68 berechnet.

Pflüger[3]) hat aber gezeigt, daß dieser Faktor niedriger angesetzt werden muß, mit 3·2. Der Vergleich der C-Einfuhr mit der C-Ausfuhr

---

[1]) *Abderhalden*, Weiterer Beitrag etc. 8. Mitt. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 57. S. 348 (1908); 10. Mitt. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **61**. S. 194 (1909).

[2]) *Pettenkofer* und *Voit*, Über die Zersetzungsvorgänge im Tierkörper bei Fütterung mit Fleisch. Zeitschr. f. Biol. Bd. 7. S. 487 (1871).

[3]) *Pflüger*, Über die Entstehung von Fett aus Eiweiß im Körper der Tiere. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **51**. S. 229 (1892).

gibt die C-Bilanz. *Voit,* der mit dem Faktor 3·68 arbeitete, berechnete eine so erhebliche C-Retention, daß die Annahme eines Fettansatzes kaum zu umgehen war. *Pflüger* erhielt aber bei der Durchrechnung der *Voit*schen Versuche unter Zugrundelegung des Faktors 3·2 nur ganz unwesentliche C-Retentionen, die innerhalb der Fehlergrenzen der Methoden lagen.

Dagegen gelingt der Nachweis einer erheblichen C-Retention bei starker Überernährung mit Fleisch, wobei dann auf das Bestehen von N-Gleichgewicht kein Wert gelegt wird. Besser als Hunde[1]) eignen sich nach *Cremer* zu solchen Versuchen Katzen[2]); besonders nach einer längeren Hungerperiode kann man diesen Tieren sehr große Fleischmengen beibringen; weibliche Katzen lassen sich auch katheterisieren.

Beispiel:

Ein Kater erhält nach einer Hungerperiode 8 Tage lang täglich 450 *g* Fleisch und wird dann getötet. Schlußgewicht: 3·7 *kg*.

Die tägliche N-Ausscheidung beträgt 13·0 *g*.

Daraus berechnet sich der C des im Körper zersetzten Fleisches 13·0 × 3·20	41·6 C
Ausgeschiedener C in Harn, Kot, Ausatmungsluft 7·5 + 1·4 + 25·4	34·3 C
Täglich retinierte (angesetzte) C-Menge	7·3 *g* C;

in der ganzen 8tägigen Periode also 58·4 *g* C entsprechend 67·1 *g* Fett oder 130 *g* Glykogen. Daß diese große Menge von C nicht in Form von Glykogen angesetzt worden sein kann, ergibt die Untersuchung des getöteten Tieres; es enthält höchstens 35 *g*. Da andere N-freie oder N-arme Substanzen, die sich in so großer Menge im Organismus anhäufen könnten, nicht bekannt sind, so darf man aus dem Versuch mit größter Wahrscheinlichkeit auf die Entstehung von Fett aus Eiweiß schließen.

D. Methoden, welche den Übertritt von Zwischenprodukten des normalen Stoffwechsels in die Exkrete bewirken.

1. Der Versuch, intermediäre Produkte durch Einleitung einer kräftigen Diurese auszuschwemmen[3]), gelingt im allgemeinen nicht. Durch Einleitung einer Diurese wird nur die Menge der normalen Endprodukte des Harns vorübergehend etwas gesteigert. Auch bei den extremsten Formen der Polyurie, wie sie sich z. B. beim Diabetes insipidus findet, ist die relative Zusammensetzung des Harns im wesentlichen normal. Ein einziger Stoff macht, soweit bisher bekannt, eine Ausnahme: der Inosit. Während er im normalen Harn nur in Spuren vorkommt, ist er in polyurischen Harnen verschiedener Ätiologie häufig in reichlicheren

[1]) *Erwin Voit,* Über die Fettbildung aus Eiweiß. Münchn. med. Wochenschr. Bd. **39**. S. 460 (1892).

[2]) *Cremer,* Über Fettbildung aus Eiweiß bei der Katze. Münchn. med. Wochenschrift. Bd. **44**. S. 811 (1897); Zeitschr. f. Biol. Bd. **38**. S. 309 (1899).

[3]) *H. Lüthje* (Zur Frage der Eiweißsynthese im tierischen Körper. Archiv f. d. gesamte Physiologie. Bd. **113**. S. 548 [1906]) hat zum Zweck der Ausschwemmung intermediärer Produkte das Glyzerin vorgeschlagen; bei einem 18—20 *kg* schweren Hunde kann man so tägliche Urinmengen von 11—12 *l* erzielen.

Mengen gefunden worden: so bei Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Schrumpfniere und vor allem auch bei Polyurie infolge von reichlicher Flüssigkeitsaufnahme. So hat *F. Strauß*[1]) bei 3 gesunden Menschen durch Trinkenlassen von zirka 10 *l* Wasser innerhalb 12—24 Stunden eine erhebliche Inositausscheidung im Harn erzielt. *E. Külz*[1]) machte ähnliche Versuche am Kaninchen: er ließ durch 5 Stunden aus einer Bürette 1% NaCl-Lösung in die V. jugularis einlaufen (alle 5 Minuten 25—30 cm^3). Aus dem Harn (1079 cm^3) konnten 32 *mg* abgeschieden werden.

Abderhalden[2]) hat die Überschwemmung des Körpers mit großen Wassermengen dazu benützt, um Aufklärung darüber zu erhalten, in welcher Form der bei eiweißreicher Kost im Körper zurückbleibende (und bei einer anschließenden Hungerperiode wieder im Harn erscheinende) Stickstoff im Körper retiniert wird (von *C. Voit* als „zirkulierendes Eiweiß" gedeutet). Es gelang bei Hunden, die reichlich mit Eiweiß gefüttert worden waren und dabei N retiniert hatten, durch Einführung von 1 *l* Wasser (mit der Schlundsonde) während des letzten Futtertages eine bedeutende Menge von N auszuschwemmen (Steigerung der N-Ausscheidung von 4·96 auf 6·53 *g*); am ersten Hungertage blieb dann die sonst zu beobachtende vermehrte N-Ausscheidung aus. Da es wenig wahrscheinlich ist, daß die reichliche Wasserzufuhr einen gesteigerten Eiweißzerfall bewirkt, so ist zu schließen, daß der N nicht in Form von Eiweiß retiniert war.

In dem Atophan (Phenylcinchoninsäure) scheinen *Nicolaier* und *Dohrn*[3]) ein Mittel gefunden zu haben, das es gestattet, einen bestimmten Stoff, die Harnsäure, aus dem Körper auszuschwemmen; in Gaben von 3—4 *g* (per os) steigert es beim Menschen die U-Ausscheidung sehr bedeutend; ebenso beim Hunde (0·5 *g* subkutan, mit Soda gelöst), unter gleichzeitigem Sinken des Allantoins; beim Huhn setzt es eine Störung der U-Synthese.[4]) Von dem näheren Studium sind noch Aufklärungen über den intermediären Nukleinstoffwechsel zu erwarten.

2. Man hat Nahrungsstoffe (resp. Stoffe, die bei der Verdauung im Darmkanal aus ihnen entstehen) in exzessiv großer Menge zugeführt, in der Erwartung, daß so großen Anforderungen gegenüber die Abbauvorrichtungen des Organismus nicht mehr völlig ausreichen würden, so daß unverbrannte Zwischenprodukte in den Harn übertreten.

---

[1]) *F. Strauß*, Die einfache zuckerlose Harnruhr. Dissertation Tübingen. 1870. — *E. Külz*, Über das Auftreten von Inosit im Kaninchenharn. Zentralblatt f. d. med. Wissensch. Bd. **13**. S. 932 (1875).

[2]) *Abderhalden*, Studien über den Eiweißstoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **59**. S. 177 (1909).

[3]) *Nicolaier* und *Dohrn*, Über die Wirkung der Chinolinkarbonsäuren und ihrer Derivate auf die Ausscheidung der Harnsäure. D. Arch. f. klin. Med. Bd. **93**. S. 331 (1908).

[4]) *Frank* und *Bauch*, Über den Angriffspunkt des Atophans bei seiner Einwirkung auf die Harnsäureausscheidung. Berl. klin. Wochenschr. Bd. **48**. Nr. 32 (1911). — *Starkenstein*, Über die Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Phenylcinchoninsäure (Atophan). Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **65**. S. 177 (1911).

P. Mayer[1]) hat nach Verfütterung großer Mengen von Traubenzucker an Kaninchen (40 *g* innerhalb 6 Stunden) eine Steigerung der Glykuronsäure- und der Oxalsäureausscheidung beobachtet und betrachtet deshalb diese beiden Säuren als normale Oxydationsprodukte des Zuckers.

Nach Zufuhr großer Mengen von Tyrosin hat *Blendermann*[2]) bei einem Kaninchen Oxyphenylmilchsäure im Harn gefunden.

Neuberg und *Langstein*[3]) haben aus dem Harn hungernder Kaninchen nach der Verfütterung von 20—30 *g* Alanin Milchsäure (2 *g* Zinksalz) isolieren können.

Baumgarten und *Popper*[4]) haben gefunden, daß Hunde, bei gemischter Kost, nach intraperitonealer Injektion von Buttersäure oder Isovaleriansäure (als NH_3-Salz 1—2 *g* pro *kg*) erhebliche Mengen von Aceton ausscheiden.

Nach *Blum*[5]) kann man beim normalen Hund auch vom subkutanen Gewebe aus durch Überschwemmung des Körpers mit Buttersäure, Isovaleriansäure oder Capronsäure Acetonkörperausscheidung erzielen; man wählt junge, glykogenarme Tiere (3—5 *kg* Körpergewicht) und injiziert 10—22 *g* buttersaures Natrium.

Die Ergebnisse dieser Methodik sind jedoch nicht völlig überzeugend. Wenn der zu untersuchende Stoff in so großen Mengen durch den Darmkanal eingeführt wird, so unterliegt er zunächst der Einwirkung der bakteriellen Darmzersetzung, wobei Stoffe entstehen können, die in den Harn übergehen und dort als unvollkommen zersetzte intermediäre Produkte imponieren. Aber auch in den Geweben selbst können, wenn bei außerordentlichen Anforderungen die gewöhnlichen Abbaumechanismen nicht ausreichen, an ihrer Stelle abnorme Veränderungen der in abundanter Menge gegebenen Substanz stattfinden.

3. Ein weiteres Verfahren, um intermediäre Produkte in den Harn überzuleiten, beruht auf folgendem: Viele eingeführte, körperfremde Stoffe erscheinen im Harn „gepaart" mit Atomenkomplexen, die offenbar dem Bestande des Organismus entstammen. Mit dieser Paarung wird in der Regel eine Entgiftung der zugeführten Substanz erreicht. Es liegt die Annahme nahe, daß diese aus dem Körper herausgenommenen Komplexe Produkte des intermediären Stoffwechsels sind; es gelänge also in dieser

---

[1]) *P. Mayer*, Über unvollkommene Zuckeroxydation im Organismus. Deutsche mediz. Wochenschr. Bd. **27**. S. 243 und 262 (1901). — Experimentelle Untersuchungen über den Abbau des Zuckers im Tierkörper. Verhandlungen d. 19. Kongr. f. inn. Med. S. 393 (1901).

[2]) *Blendermann*, Beiträge zur Kenntnis der Bildung und Zersetzung des Tyrosins im Organismus. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **6**. S. 234 (1882).

[3]) *Neuberg* und *Langstein*, Ein Fall von Desamidierung im Tierkörper. Arch. f. Anat. u. Physiol. Abt. f. Physiol. 1903. Suppl. S. 514.

[4]) *Baumgarten* und *Popper*, Experimentelle Untersuchungen über Acetonurie beim Hund. Zentralblatt f. Physiol. Bd. **20**. S. 377 (1906).

[5]) *Blum*, Über den Abbau der Fettsäuren im Organismus und über die gegenseitigen Beziehungen der Acetonkörper. Münch. med. Wochenschr. Bd. **57**. S. 683 (1910).

Weise, Zwischenprodukte aus den Geweben mit der chemischen Angel gleichsam herauszufischen. Doch ist in jedem speziellen Fall die Berechtigung dieser Auffassung einer besonderen Prüfung zu unterwerfen, denn es ist auch möglich, daß der vom Organismus gelieferte „Paarling" erst unter dem Einfluß der eingegebenen Substanz entstanden ist.

Auch die Muttersubstanzen dieser Paarlinge können festgestellt werden, wenn es gelingt, die quantitativen Verhältnisse der Paarung durch gleichzeitige Zufuhr von Nahrungssubstanzen oder bekannten intermediären Produkten zu beeinflussen.

Abgesehen von der Synthese mit Schwefelsäure, welche sicher ein Endprodukt des Stoffwechsels ist, kommen folgende Paarungen in Betracht:

I. Die Paarung mit Glykuronsäure, welcher zahlreiche, in den Organismus eingeführte Substanzen unterliegen; besonders Kaninchen zeigen eine Neigung zu dieser Art der Entgiftung.

Schmiedeberg und *H. Meyer*[1]) haben die Auffassung vertreten, daß die Glykuronsäure im normalen Organismus als Zwischenprodukt bei der Verbrennung des Traubenzuckers auftritt und nun infolge der Paarung der weiteren Zersetzung entgeht. *Sundvik* und besonders *Emil Fischer* und *Piloty* haben dagegen die Vermutung ausgesprochen, daß die eingeführte Substanz sich wahrscheinlich zunächst mit Traubenzucker verbindet und daß das so gebildete Glukosid eine Oxydation zur gepaarten Glykuronsäure erfahre. Für diese, vom Standpunkt des Chemikers einleuchtende Erklärung haben sich aber bisher noch keine entscheidenden Beweise beibringen lassen. Man hat die Frage in der Weise zu studieren versucht, daß man untersuchte, ob zugeführte Glukoside im Körper in die entsprechenden gepaarten Glykuronsäuren übergehen. Man hat zum Teil positive Resultate erhalten.[2]) Diese lassen aber immer noch die Deutung zu, daß zunächst eine Aufspaltung des Glukosides und dann erst sekundär eine Synthese des freigewordenen Paarlings mit Glykuronsäure stattgefunden habe. Bei diesen Versuchen sind vor allem auch die Isomerieverhältnisse der Glukoside und der gepaarten Glykuronsäuren (α- und β-Form) zu berücksichtigen.

Man hat auch die Frage aufgeworfen, ob denn der Traubenzucker überhaupt als Muttersubstanz der Glykuronsäure angesehen werden kann

---

[1]) *Schmiedeberg* und *H. Meyer*, Über Stoffwechselprodukte nach Kampferfütterung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 3. S. 422 (1879).

[2]) *Brahm*, Über Chinosol, sein Verhalten im Tierkörper und über die Bildung gepaarter Glykuronsäure. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 28. S. 439 (1899). — *Mörner*, Über das Verhalten einiger künstlicher Hexosen im Tierkörper. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 29. S. 493 (1900). — *Falck*, Über das Verhalten einiger Glykoside sowie über die Entstehung gepaarter Glykuronsäuren im Tierkörper. Münchn. med. Wochenschr. Bd. 49. S. 1489 (1902). — *Hildebrandt*, Über Synthesen im Tierkörper. Arch. f. exp. Pathologie u. Pharmakologie. Bd. 44. S. 308 (1900); Bd. 45. S. 110 (1901). — Über eine experimentelle Stoffwechselabnormität. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 35. S. 150 (1902). — Zur Frage der glykosidischen Struktur gepaarter Glykuronsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 7. S. 439 (1906).

Nach der chemischen Konstitution muß das ja von vornherein als recht wahrscheinlich erscheinen. Die Frage läßt sich auf dem Wege untersuchen, daß man feststellt, ob die Menge Glykuronsäure, die ein Tier zur Paarung beistellen kann, abhängig ist von seinem Gehalt an Kohlenhydrat. Die Versuche sind zweckmäßig so anzuordnen, daß man zunächst dem in normaler Weise ernährten Tiere eine genügende Menge einer zur Glykuronsäurepaarung befähigten Substanz zuführt und im Harn die Menge der ausgeschiedenen gepaarten Säuren bestimmt (durch die Stärke der Linksdrehung). Die Autoren haben in der Regel Chloralhydrat oder Kampfer gegeben; gegen die Wahl dieser Substanzen ist jedoch einzuwenden, daß damit recht komplizierte Versuchsbedingungen geschaffen werden, weil diese beiden Substanzen gar nicht direkt zur Glykuronsäurepaarung herangezogen werden können, sondern zuerst im Organismus eine vorbereitende Veränderung erfahren müssen. (Reduktion zu Trichloräthylalkohol, Oxydation zu Kampferol.) Das Chloralhydrat ist ferner aus dem Grunde ungeeignet, weil es den Glykogenstoffwechsel beeinflußt *(Nebelthau)*. Der Kampfer scheint ebenfalls eine eigenartige Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu haben, wenigstens kommt *O. Löwi* zu der Annahme, daß er die Zuckerausscheidung beim Phlorhizindiabetes direkt beeinflußt. Geeigneter für derartige Versuche dürften Paarlinge sein, die unmittelbar, ohne vorausgehende Veränderung, zur Synthese herangezogen werden und die eine relativ geringe Giftwirkung haben, so daß größere Dosen verwendet werden können: Menthol, Borneol, Thymol, Naphthol, eventuell auch tertiärer Butylalkohol. Dann wird das Tier durch eine der oben beschriebenen Methoden möglichst glykogenfrei gemacht (z. B. Kombination von Hunger und Phlorhizin, Hunger und Arbeit). Darauf wird ihm die gleiche Dosis des Glykuronsäurepaarlings verabreicht und der Harn untersucht. Nach *P. Mayer*[1]) ergibt sich, daß nun weniger gepaarte Glykuronsäure ausgeschieden wird als vom gefütterten Tier. Dann erhält dasselbe Versuchstier ein drittes Mal dieselbe Dosis des Paarlings, gleichzeitig mit einer großen Menge Traubenzucker. *P. Mayer* fand, daß dann wieder etwa dieselbe Menge gepaarter Säure ausgeschieden wird wie vom gefütterten Tier, und schließt daraus, daß Glykuronsäure aus Zucker entsteht.

In gleichem Sinne sprechen die Resultate von *Hildebrandt*.[2]) Er zeigte, daß Kaninchen bei gleichzeitiger Verabreichung von Zucker Thymotinpiperidid in größerem Ausmaße an Glykuronsäure paaren und deswegen auch besser entgiften. Auch für Thujon stellte er eine entgiftende Wirkung gleichzeitiger Zuckergaben fest.

Eine etwas andere Methodik wählte *O. Loewi*.[3]) Er unterhielt bei Hunden, um sie glykogenfrei zu machen, einen maximalen Phlorhizin-

---

[1]) *Paul Mayer*, Experimentelle Untersuchungen über Kohlenhydratsäuren. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **47**. S. 68 (1902).

[2]) *H. Hildebrandt*, Über einige Synthesen im Tierkörper. I. Mitt. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **44**. S. 278 (1900).

[3]) *O. Loewi*, Einfluß des Kampfers auf die Zuckerausscheidung im Phlorizindiabetes. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **47**. S. 56 (1903).

diabetes, dann reichte er Kampfer (auch hier wäre wohl die Wahl eines anderen Paarlings vorzuziehen), der als Kamphoglykuronsäure ausgeschieden wurde. Wenn nun die Glykuronsäure aus dem Zucker stammte, so mußte während der Kampferperiode die Menge des ausgeschiedenen Zuckers abnehmen. In den *Loewi*schen Versuchen fand nun tatsächlich ein Sinken der Zuckerausscheidung statt; doch war diese durch gleichzeitige Einschränkung des Eiweißumsatzes zu erklären. Die Versuchsbedingungen liegen hier also recht kompliziert. *Loewi* glaubt, aus dem Versuch schließen zu dürfen, daß die Glykuronsäure nicht aus Zucker oder zuckerbildenden Komplexen entsteht.

II. **Paarung mit Glykokoll.** Sie tritt bei einer Anzahl von aromatischen Säuren ein; sie ist zum Studium intermediärer Stoffwechselvorgänge wiederholt herangezogen worden. Als Paarling wurde gewöhnlich die einfachste der hierher gehörigen Substanzen, die Benzoesäure, verwendet. (Paarungsprodukt: Hippursäure.) Geeignete Versuchstiere sind: Kaninchen und Schaf; bei Hunden und Menschen findet die Glykokollpaarung in kleinerem Umfange statt.

Wiener[1]) hat als erster die quantitative Verfolgung der Glykokollpaarung in systematischer Weise dazu verwertet, um Aufschlüsse über die Bedeutung des Glykokolls im intermediären Stoffwechsel zu erhalten. Er hat in einer Reihe von Versuchen, in welchen eine einmalige Dose von 1·0—1·56 *g* Benzoesäure pro Kilogramm Kaninchen per os gegeben wurde, im Harn der folgenden vier Tage regelmäßig rund 0·8 *g* Benzoesäure in gepaarter Form als Hippursäure gefunden. Dieser Maximalwert tritt bei einer Dosis von mindestens 1·0 *g* Benzoesäure pro Kilogramm Tier in Erscheinung. Er entspricht einer Menge von 0·49 (nicht 0·54 *g*) Glykokoll.

Wiener betrachtete diese Menge als den „Glykokollvorrat" des Tieres. Darunter verstand er die Menge, über welche das Tier im Zeitpunkte der Darreichung verfügt, vermehrt um die Menge, welche es in den nächsten Stunden (solange noch freie Benzoesäure im Blute kreist) bildet.[2]) Damit wäre eine Methode gegeben, um die Muttersubstanzen des Glykokolls kennen zu lernen; wenn nach Zufuhr einer Substanz, z. B. Leucin, das Tier mehr als 0·8 *g* Benzoesäure zu paaren vermag, so wäre das ein Zeichen, daß sein Glykokollvorrat durch die eingegebene Substanz vermehrt worden ist.

---

[1]) *Wiener*, Über das Glykokoll als intermediäres Stoffwechselprodukt. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **40**. S. 313 (1897); Über den Glykokollvorrat des tierischen Organismus. Prager medizin. Wochenschr. Bd. **26**. Nr. 50 (1901); Bd. 27. Nr. 24 (1902). — Siehe ferner *R. Cohn*, Über den Glykokollvorrat im tierischen Organismus. Festschrift zur Feier des 60. Geburtstages von *Max Jaffé*. 1901. S. 321; Zur Frage des Glykokollvorrats im tierischen Organismus. Prager med. Wochenschr. Bd. 27. S. 269 (1902); Zur Frage der Glykokollbildung aus Leucin im tierischen Organismus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 48. S. 177 (1902).

[2]) Mehr Glykokoll erhält man, wenn die Benzoesäurezufuhr nicht auf einmal erfolgt, sondern in mehreren Dosen über den Tag verteilt. *Parker* und *Lusk*, On the maximum production of hippuric acid in rabbits. Amer. Journ. of Physiol. Bd. 3. S. 472 (1900).

Eine Bestätigung kann noch dadurch geliefert werden, daß nun das Tier eine sonst letale Dosis von Benzoesäure (annähernd 1·7 *g* pro Kilogramm Kaninchen) überlebt.

Es hat sich jedoch herausgestellt, daß diese im Prinzip richtige Methodik doch gewisser Vorsichtsmaßregeln bedarf. Es hat sich ergeben, daß der „Glykokollvorrat" verschiedener Kaninchen, auf 1 *kg* Körpergewicht berechnet, nicht immer gleich groß ist. *Wiener* hat selbst einen Versuch mitgeteilt, in welchem 1·0381 *g* Benzoesäure pro Kilogramm ausgeschieden wurden.[1]) Nach den eingehenden gründlichen Studien von *Wiechowski*[2]) ist dagegen der Umfang der Hippursäuresynthese pro Kilogramm Tier bei demselben Individuum und bei gleichmäßiger Zufuhr von Benzoesäure konstant.[2]) Man wird also nach *Wiechowskis* Vorschlägen derartige Versuche künftig in folgender Weise ausführen müssen:

Das Tier erhält zunächst eine Benzoesäuregabe, um das dauernde kleine Glykokolldepot des Organismus zu erschöpfen.

24 Stunden später wird in einem Vorversuch das normale Ausmaß der Hippursäuresynthese für das Tier bestimmt. Es wird Benzoesäure als Na-Salz auf einmal subkutan oder intravenös injiziert. Zur subkutanen Injektion empfiehlt *Wiechowski* eine 4⁰/₀ige Lösung; konzentriertere Lösungen sind schmerzhaft und weniger genau zu dosieren. Man läßt die Lösung den aufgespannten Tieren aus einer Bürette mit Injektionsnadeln langsam unter Massage unter die Rückenhaut fließen. Um Diarrhöen zu vermeiden und um vergleichbare Werte zu erhalten verwendete *Wiechowski* stets 0·8 *g* Benzoesäure pro Kilogramm Tier. In dem quantitativ gesammelten Harn wird der N, die Hippursäure und die nicht gepaarte Benzoesäure quantitativ bestimmt (Methoden siehe dieses Werk, Band III, S. 829, ferner *Wiechowski*, a. a. O.). Ein Teil der verabreichten Benzoesäure wird weder in freiem Zustand, noch als Hippursäure wieder gefunden („Defizit").

Im Hauptversuch erhält nun das Tier wieder benzoesaures Natron in gleicher Dose und gleicher Konzentration wie im Vorversuch, und außerdem die auf ihr Glykokollbildungsvermögen zu untersuchende Substanz.

Eine Änderung der pro Kilogramm berechneten Hippursäurewerte darf aber nach *Wiechowski* noch nicht ohne weiteres auf eine Änderung des Glykokollbestandes bezogen werden. Durch die Zufuhr der Substanz könnte auch die synthetische Energie des Tierkörpers beeinflußt worden sein. *Wiechowski* schlägt vor, die Entscheidung in der Weise zu treffen, daß man an demselben oder an einem anderen Tiere Vorversuch und Hauptversuch unter gleichzeitiger Darreichung von Glykokoll wiederholt. Als Grundlage für derartige Experimente wäre übrigens eine längere Reihe von Versuchen mit gleichzeitiger Darreichung von Benzoesäure und Glykokoll (zum Studium der synthetischen Energie des Kaninchens) erwünscht.

---

[1]) *H. Wiener*, Über den Glykokollvorrat des tierischen Organismus. Prager mediz. Wochenschr. Bd. **26**. Nr. 50 (1901). Im Original ein Druckfehler (1·3381).

[2]) *Wiechowski*, Die Gesetze der Hippursäuresynthese. Beiträge z. chem. Phys. u. Path. Bd. **7**. S. 204 (1905).

Versuche mit Einhaltung aller dieser Kautelen liegen noch nicht vor. Trotzdem erlauben auch die bisherigen Experimente einige Schlüsse auf die Quellen des Glykokolls. Aus den Versuchen von *Wiechowski* und von *Magnus-Levy* ergibt sich, daß ein sehr großer Teil des Gesamt-N als Glykokoll (Hippursäure) im Harn vorhanden sein kann bis zu 64%.

Kaninchen, 2250 *g*, erhält subkutan 1·73 *g* Benzoesäure gleich 0·8 *g* pro Kilo als Na-Salz.

Gesamt-N in 24 Stunden 0·828 *g*, in 8 Stunden also 0·276 *g*.

Ausgeschiedene, gebundene Benzoesäure 1·56 *g*, gleich 0·1789 *g* Glykokoll-N, gleich 64·3% des auf 8 Stunden entfallenden Gesamt-N.

Der Berechnung darf die N-Ausscheidung von 8 Stunden zugrunde gelegt werden, weil in anderen Versuchen gezeigt worden ist, daß bei der angewendeten Dose die Hippursäureausscheidung in der 6. bis 9. Stunde vollendet ist.

Daß ein so großer Anteil des N-Gehaltes des Harns als Glykokoll erscheinen kann, ist nur unter der Annahme verständlich, daß das Eiweiß die Quelle (wenigstens die Hauptquelle) des Glykokolls ist. Da auch das hungernde Kaninchen reichlich Glykokoll bildet, so sind jedenfalls die Eiweißkörper der Gewebe als Muttersubstanzen des Glykokolls anzusehen.[1] Bei der hydrolytischen Spaltung liefern die Eiweißkörper der Gewebe aber durchschnittlich nicht mehr als 3, höchstens 4% Glykokoll. Das führt zu dem Schlusse, daß entweder der Abbau der Eiweißkörper in den Geweben nicht mit einer hydrolytischen Aufspaltung beginnt oder, was viel wahrscheinlicher ist, daß die beim hydrolytischen Abbau der Gewebe entstehenden Aminosäuren zum Teil in Glykokoll übergehen. Es könnte das durch einfachen Abbau oder aber durch Synthese des abgespaltenen Ammoniaks mit stickstofffreien Bausteinen entstehen.

Es ist auch an die Möglichkeit zu denken, daß der Eiweißabbau unter dem Einfluß der Benzoesäurezufuhr anders verläuft als im normalen Organismus.

Magnus-Levy[2] hat die Frage diskutiert, ob die Benzoesäure sich vielleicht an verschiedene Aminosäuren bindet, diese dadurch vor dem normalen Abbau schützt und einem abnormen, zur Hippursäurebildung führenden Abbau aussetzt; dann müßten injizierte Benzoylaminosäuren auch zu Hippursäure abgebaut werden; das ist jedoch nicht der Fall; sie werden unzersetzt ausgeschieden.

III. Methylierung. Diese Synthese hat deshalb ein besonderes Interesse, weil sie vielleicht im normalen Stoffwechsel eine Rolle spielt. *Jaffé* und sein Schüler *Dorner*[3] haben gezeigt, daß man durch stomachale Injektion von Guanidinessigsäure (Glykocyamin) beim Kaninchen eine Vermehrung der Kreatinausscheidung erzielen kann; das entspricht einer Methylierung der eingegebenen Substanz; darnach ist es nicht unwahrschein-

---

[1]) *Parker* und *Lusk*, a. a. O.

[2]) *Magnus-Levy*, Über das Verhalten benzoylierter Aminosäuren im Organismus. Biochem. Zeitschr. Bd. 6. S. 541 (1907).

[3]) *Jaffé*, Untersuchungen über die Entstehung des Kreatins im Organismus. Zeitschrift f. phys. Chem. Bd. 48. S. 430 (1906). — *Dorner*, Zur Bildung von Kreatin und Kreatinin im Organismus, besonders des Kaninchens. Ebenda. Bd. 52. S. 225 (1907).

lich, daß Guanidinessigsäure ein Zwischenprodukt bei der normalen Kreatinbildung ist.

IV. Das Studium einer anderen im normalen Organismus stattfindenden Synthese, der Bildung der Taurocholsäure der Galle, hat wertvolle Aufschlüsse über den Cystinstoffwechsel gebracht. *v. Bergmann*[1]) arbeitete an Hunden mit vollständigen Gallenfisteln (siehe dieses Werk, Bd. 3 I, S. 110): die Galle wurde in einem am Hals aufgehängten Gummibeutel[2]) quantitativ aufgefangen; die 24stündige Menge wurde gemessen, mit einem Vielfachen des Volumens 96%igen Alkohols auf ein rundes Volumen (z. B. 500 cm^3) aufgefüllt, unter Vermeidung einer Volumänderung durch Verdunsten filtriert, und dann in einem aliquoten Teil des Filtrates (z. B. in 50 cm^3) der S-Gehalt bestimmt (siehe dieses Werk, Bd. 1, S. 370); der gefundene Wert kann als Maß des Taurocholsäuregehaltes betrachtet werden. Zufuhr von Cystin allein bewirkt keine Steigerung der Taurocholsäureproduktion; dagegen wird diese durch Eingabe von Cholsäure (als Na-Salz) beträchtlich vermehrt, so daß geschlossen werden muß, daß dem Organismus ein gewisser Vorrat von Taurin resp. seiner Muttersubstanz zur Verfügung steht; es läßt sich nun weiter zeigen, daß dieser Vorrat durch fortgesetzte Cholsäuredarreichung erschöpft und dann durch Cystinzufuhr wieder ersetzt werden kann.

Z. B. 8·6 *kg* schwerer Hund, ernährt mit 200 *g* Fleisch, 150 *g* Reis und 30 *g* Kasein. S in der Galle in 24stündigen Perioden: 0·092—0·107—**0·230**—**0·192**—**0·157** **0·113**—**0·237***—**0·215**—**0·139**—0·139—0·074—0·099. Die fettgedruckten Zahlen betreffen Tage, an welchen 2·0 *g* cholsaures Na gegeben wurde; an dem mit * bezeichneten Tage erhielt das Tier außerdem 1·2 *g* Cystin.

Damit ist erwiesen, daß Cystin die Muttersubstanz der Taurinkomponente der Taurocholsäure ist.

Kaninchen sind zur Anlegung von Gallenfisteln nicht geeignet; die Bestimmung des prozentischen Taurocholsäuregehaltes in der Galle des getöteten Tieres[3]) ist aber nur ein sehr unvollkommener Ersatz für fortlaufende quantitative Bestimmungen in der 24stündigen Menge.

Andere Synthesen im Organismus, wie die Paarungen mit Essigsäure, Karbaminsäure, Ornithin, Merkaptursäure, sind bisher für die Erforschung des intermediären Stoffwechsels noch nicht verwertet worden.

E. Untersuchung der Schicksale in den Tierkörper eingeführter Substanzen.

1. Schicksale intermediärer Stoffwechselprodukte.

Die Untersuchung der Veränderungen eingeführter Substanzen im Tierkörper liefert wichtige Anhaltspunkte zur Beantwortung der Frage, ob eine

[1]) *G. v. Bergmann,* Die Überführung von Cystin in Taurin im tierischen Organismus. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. **4**. S. 192 (1904).

[2]) *Dastre,* Opération de la fistule biliaire. Archive de Physiologie. Vol. **22**. p. 714 (1890).

[3]) *Wohlgemuth,* Über die Herkunft der schwefelhaltigen Stoffwechselprodukte im tierischen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **40**. S. 81 (1903).

Substanz ein Produkt des intermediären Stoffwechsels ist. Als Zwischenprodukte des Stoffwechsels können nur solche Stoffe gelten, die, in den Organismus eingeführt, zu normalen Endprodukten des Stoffwechsels abgebaut werden (soweit sie nicht etwa als Reservestoffe abgelagert werden). Substanzen, welche diese Bedingungen nicht erfüllen, besonders solche, die größtenteils oder vollständig unverändert in die Exkrete übergehen, können nicht als wesentliche Produkte des intermediären Umsatzes der Körperstoffe gedeutet werden; so z. B. Methylalkohol, Azeton, Ameisensäure, Oxalsäure.[1])

Gewisse Einschränkungen dieses allgemeinen Satzes wird man allerdings zugeben müssen. Es ist wohl möglich, daß Substanzen, wenn sie im intermediären Stoffwechsel allmählich entstehen, „in statu nascendi" leichter weiter zersetzt werden, als wenn sie von außen auf einmal in größerer Menge dem Körper zugeführt werden. Es ist zu berücksichtigen, daß die von außen zugeführten Substanzen zu einem gewissen Teile vielleicht gar nicht in die eigentlichen Stätten des Stoffwechsels, in denen der Abbau stattfindet, hineingelangen, besonders dann, wenn der Abbau der betreffenden Substanz nur in ganz bestimmten Organen stattfindet.

So ist die Tatsache beachtenswert, daß Hämoglobin nach intravenöser Injektion schon ganz kleiner Dosen (0·02 *g* pro Kilogramm Kaninchen[2]) unverändert in die Galle und eventuell auch in den Harn übertritt (ebenso wie Hämoglobin, das z. B. infolge Einwirkung eines Blutgiftes aus den Erythrocyten in das Plasma ausgetreten ist); es wäre natürlich falsch, daraus schließen zu wollen, daß Hämoglobin kein Zwischenprodukt des normalen Stoffwechsels ist; das in gehöriger Weise in den roten Blutkörperchen gebundene Hämoglobin geht eben nicht in die Sekrete über.

Die Umkehrung des Satzes, daß eine Substanz, die im Organismus zu Endprodukten des normalen Stoffwechsels abgebaut wird, als Produkt des intermediären Stoffwechsels zu gelten hat, ist selbstverständlich unzulässig.

Ob eine eingeführte Substanz im Körper vollständig verbrannt worden ist, ist schwer mit Sicherheit festzustellen; abgesehen von der Untersuchung des Harns auf die unveränderte Substanz und auf die zu vermutenden Abbauprodukte bietet die Bestimmung des N- und C-Gehaltes des Harns eine gute Kontrolle; das Erscheinen einer fremden Substanz im Urin wird in der Regel den sonst ziemlich konstanten Faktor C : N verändern.[3])

---

[1]) *J. Pohl*, Über die Oxydation des Methyl- und Äthylalkohols im Tierkörper. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **31**. S. 281 (1891); Über den oxydativen Abbau der Fettkörper im tierischen Organismus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 37. S. 413 (1896); Experimenteller Beitrag zum Oxalsäurestoffwechsel. Zeitschr. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **8**. S. 308 (1910/11).

[2]) *Stern*, Über das Auftreten von Oxyhämoglobin in der Galle. Virchows Archiv. Bd. **123**. S. 33 (1891).

[3]) *Spiro*, Zur Lehre vom Kohlenhydratstoffwechsel. Beitr. z. chem. Physiol. und Path. Bd. **10**. S. 277 (1907). — *Friedmann*, Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren. Ebenda. Bd. **11**. S. 153 (1908).

Neben dem Harn dürfen die übrigen Sekrete und Exkrete des Körpers nicht vergessen werden: Exspirationsluft, Speichel, Magensaft, Darmsaft, Pankreassaft, Galle, Schweiß. Die Derivate des Blutfarbstoffs werden z. B. in erster Linie durch die Galle ausgeschieden; so konnte *O. Neubauer*[1]) schon nach Injektion von 0·003 *g* Hämatoporphyrin pro Kilogramm Hund diesen Farbstoff mit Leichtigkeit in der Galle nachweisen, dagegen nicht im Urin.

Bei Substanzen, die nicht quantitativ im Harn wieder erscheinen, muß ferner an die Möglichkeit gedacht werden, daß sie zum Teil in den Geweben retiniert worden sind und später allmählich zur Ausscheidung gelangen.

Die zu prüfende Substanz muß dem Körper von außen zugeführt werden. Es stehen dazu mehrere Wege zur Verfügung.

Der Weg per os (mit dem Futter, in Gelatinekapseln, Stärkekapseln, durch die Schlundsonde) hat unleugbare Vorzüge. Die Beibringung auch größerer Mengen ist meist verhältnismäßig einfach; die Aufnahme in die Körpersäfte erfolgt ziemlich allmählich, so daß also keine plötzliche Überschwemmung des Körpers stattfindet; sie führt von vornherein in das für den Stoffwechsel wichtigste Organ: in die Leber; auch wasserunlösliche Stoffe werden meist vom Darm recht gut resorbiert. Nachteile des Fütterungsweges sind: bei Hunden das häufig auftretende Erbrechen. Dieses läßt sich manchmal vermeiden, wenn man sich nach der Fütterung mit dem Tier beschäftigt, es nach der Fütterung eine Zeitlang auf den Hinterbeinen stehen läßt. Zu dem Verfahren der Unterbindung des Ösophagus am Halse wird man nur in Ausnahmsfällen schreiten. Ein weiterer Nachteil ist, daß manche Substanzen vom Darmkanal schlecht resorbiert werden, besonders wenn Diarrhöen eintreten. Man wird eventuell die Fäzes auf unresorbiertes Material untersuchen. Es kann aber auch die gegebene Substanz im Magen und Darm verändert werden, einmal unter dem Einfluß der Verdauungssäfte, vor allem aber durch die Tätigkeit der Darmbakterien. So ist es zu erklären, daß z. B. per os gegebene Oxalsäure nur zu einem geringen Bruchteile im Harn wieder erscheint.

Die subkutane Injektion vermeidet vor allem den letztgenannten Einwand gegen die stomachale Zufuhr. Sie erfolgt meist in wässeriger Lösung; ölige Lösungen werden oft nur sehr langsam resorbiert. Säuren werden in der Regel in der Form ihrer Na-Salze injiziert; die Na-Salze schwacher Säuren sind häufig so stark hydrolytisch dissoziiert, daß sie intensiv alkalisch reagieren und infolgedessen starke Schmerzen und Nekrosen an der Injektionsstelle verursachen. In manchen Fällen verdient dann die Lösung der Säuren in organischen Basen, wie Piperazin oder Lysidin, den Vorzug. So können Harnsäure, Xanthin, Hypoxanthin, Allantoin, Tyrosin, Leucin als Piperazinsalze gelöst werden.[2]) Zum Beispiel: Harnsäure 0·5,

[1]) *O. Neubauer,* Hämatoporphyrin und Sulfonalvergiftung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **43**. S. 456 (1900).

[2]) *Salkowski,* Kleinere Mitteilungen physiologisch-chemischen Inhalts. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **56**. S. 349 (1894).

Piperazin 1·0, Aqua 30·0, eventuell verwendet man leichtlösliche Doppelsalze (z. B. bei Koffein, Theobromin etc.). Bei der subkutanen Injektion wird der Organismus oft mit dem injizierten Stoffe rasch überschwemmt, und es können dann auch relativ leicht verbrennliche Körper (Traubenzucker) zu einem gewissen Teil in den Harn übergehen; durch Injektion in mehreren Dosen kann man diesem Übelstand einigermaßen abhelfen. Auf jeden Fall wird man aus dem Auftreten einer mäßigen Menge unveränderter Substanz im Harn nicht schließen dürfen, daß die Substanz kein intermediäres Produkt ist.

Für die intravenöse Injektion gilt das in noch höherem Maße. Sie hat aber den Vorteil, daß auf diesem Wege auch manche Substanzen beigebracht werden können, die wegen ihrer stark reizenden Eigenschaften auf anderem Wege nicht gut einführbar sind (z. B. Harnsäurelösungen). Vor allem werden stark alkalische Lösungen intravenös besser ertragen als subkutan. Technik der intravenösen Injektion siehe dieses Werk, Bd. 3, I, S. 120.

Die übrigen zur Verfügung stehenden Wege, die rektale Applikation, die intraperitoneale und die intraarterielle Einspritzung, sowie das Einatmenlassen kommen nur in besonderen Fällen in Betracht.

Außer auf die Verbrennlichkeit ist auf eine etwaige Giftwirkung der Substanz zu achten. Man darf den Satz aufstellen, daß intermediäre Stoffwechselprodukte im allgemeinen nicht giftig sind; aus diesem Grunde können Oxalsäure, CO, HCN keine in größerer Menge auftretenden Stoffwechselprodukte sein. Auch dieses Gesetz hat seine Ausnahmen: Adrenalin, Thyreojodin sind starke Gifte, und doch sind sie sicher intermediäre Produkte. Aber es sind intermediäre Produkte, die doch nur in sehr geringer Menge auftreten. Andere, weniger giftige Substanzen könnten sogar auch in größerer Quantität im Stoffwechsel eine Rolle spielen, so vielleicht der Äthylalkohol. Es kommt hier die Möglichkeit in Betracht, daß eine Substanz zwar bei subkutaner Injektion oder bei Darreichung per os sich als giftig erweist, daß sie aber ihre giftigen Eigenschaften nicht zur Geltung bringen kann, wenn sie im Stoffwechsel in einem bestimmten Organe entsteht, weil sie vielleicht rasch weiter verändert wird oder weil sie ihre Giftwirkung nur in einem anderen entfernten Organ, etwa im Zentralnervensystem, entfalten könnte.

2. Schicksale körperfremder Substanzen.

Auch die Untersuchung des Schicksales von Substanzen, die nicht zu Endprodukten verbrannt werden, die also nicht als Zwischenprodukte gedeutet werden können, ist für die Erforschung des Stoffwechsels von Wert. Das Studium der Veränderungen, welche solche körperfremde Stoffe im Organismus erfahren, hat wichtige Aufklärungen auch für das Schicksal der Körpersubstanzen gebracht. Das chemische Rüstzeug, mit welchem der

Organismus körperfremde und körpereigene Substanzen angreift, ist ja schließlich dasselbe. Daß die körperfremden Substanzen in vielen Fällen nicht vollständig verbrannt werden, ist für das Studium geradezu ein großer Vorteil. Denn gerade diese Endprodukte der körperfremden Substanzen dürften vielfach den Zwischenprodukten beim Abbau der Körpersubstanzen entsprechen. Andererseits muß man immer die Möglichkeit im Auge behalten, daß fremde Substanzen vom Organismus mitunter auch prinzipiell ganz anders behandelt werden als die körpereigenen. Die Übertragung der an den ersteren gewonnenen Erfahrungen auf letztere bleibt also immer nur ein Analogieschluß, der zu seiner Sicherstellung weiterer Stützen bedarf. Je ähnlicher die untersuchte Substanz einer Substanz des Körpers ist, desto berechtigter wird ein solcher Analogieschluß sein. Doch ist zu beachten, daß mitunter schon ganz geringfügige Unterschiede, z. B. Unterschiede in der optischen Aktivität, in der geraden oder ungeraden Anzahl der C-Atome, in der verschiedenen Stellung einer OH-Gruppe im Benzolring usw. prinzipielle Unterschiede des Verhaltens im Organismus bedingen.

Im Folgenden seien einige Beispiele für die Verwertung solcher Untersuchungen angeführt:

Untersuchungen von *Knoop*[1]) an der Reihe der einbasischen vom Benzol sich ableitenden Fettsäuren mit verschieden langer saurer Seitenkette

$C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . CH_2 . CH_2 . COOH$	Phenylvaleriansäure
$C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . CH_2 . COOH$	Phenylbuttersäure
$C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . COOH$	Phenylpropionsäure
$C_6H_5 . CH_2 . COOH$	Phenylessigsäure
$C_6H_5 . COOH$	Benzoesäure

haben folgendes ergeben:

Die Säuren mit einer ungeraden Anzahl von C-Atomen in der Seitenkette (Phenylvaleriansäure, Phenylpropionsäure, Benzoesäure) werden als Benzoesäure, gebunden an Glykokoll, ausgeschieden.

Die Säuren mit einer geraden Anzahl von C (Phenylbuttersäure, Phenylessigsäure) dagegen als Phenylessigsäure, ebenfalls mit Glykokoll gepaart. Daraus geht hervor, daß der Abbau der Phenylvaleriansäure und der Phenylpropionsäure zu Benzoesäure jedenfalls nicht über Phenylbuttersäure und Phenylessigsäure erfolgt, andrerseits der Abbau der Phenylbuttersäure nicht über Phenylpropionsäure. Es werden also beim Abbau der Seitenkette die C-Atome offenbar immer paarweise abgespalten.

Untersuchungen von *Dakin*[2]) haben ferner ergeben, daß die am β-C oxydierten Säuren das Schicksal der nichtoxydierten Säuren teilen, also z. B. die Phenyl-β-Milchsäure und die Benzoylessigsäure das der Phenyl-

[1]) *Knoop,* Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. Freiburg 1904.

[2]) *Dakin,* The mode of oxydation in the animal organism of phenyl derivatives of fatty acids. Journ. of biol. chem. Vol. 6. p. 203 (1908); Vol. 6. p. 221 (1909).

propionsäure. Ferner hat er gezeigt, daß nach Zufuhr großer Mengen von Phenylvaleriansäure und Phenylpropionsäure Phenyl-β-Milchsäure im Harn auftritt. Daraus kann geschlossen werden, daß der paarweisen Abspaltung der C-Atome regelmäßig eine Oxydation am β-C vorausgeht.

Diese aromatischen Fettsäuren spielen als intermediäre Produkte zwar keine Rolle. Analoge Untersuchungen an den für den Stoffwechsel wichtigen aliphatischen Fettsäuren sind aber aus dem Grunde nicht durchführbar, weil sie, wenigstens beim Gesunden, bis zu den Endprodukten CO_2 und H_2O verbrennen. Man ist aber berechtigt, zunächst mit einer gewissen Reserve, die an den aromatischen Fettsäuren gewonnenen Erfahrungen auf aliphatische zu übertragen. Die Untersuchungen über das Schicksal der aliphatischen Fettsäuren bei pathologischen Zuständen (Acetonkörperausscheidung) und an der isolierten Leber ergeben nun tatsächlich die Bestätigung der so gefundenen Gesetze.

Auch für die Erkenntnis des Abbaues der Aminosäuren des Eiweißes können Untersuchungen an körperfremden aromatischen Substanzen als Grundlage dienen.[1]) Die im Körper nicht vorkommende Phenylaminoessigsäure geht im Organismus in die entsprechende Ketonsäure (Phenylglyoxylsäure) über: $C_6H_5 . CHNH_2 . COOH \longrightarrow C_6H_5 . CO . COOH$.

Ähnliche Erfahrungen lassen sich an anderen körperfremden Aminosäuren gewinnen.[2])

Die Isolierung der α-Ketonsäuren aus dem Harn und aus Gewebsextrakten beruht auf ihrer Löslichkeit in Äther, ihrer Fähigkeit, mit $NaHSO_3$ Verbindungen einzugehen, die in Äther nicht mehr löslich sind, aber durch Mineralsäuren sehr leicht wieder zersetzt werden können, ferner auf ihrer Eigenschaft, mit Phenylhydrazin kristallisierte Verbindungen zu geben. So läßt sich die Phenylglyoxylsäure im Harn in der Weise nachweisen, daß der (eventuell vorher eingeengte oder mit Ammonsulfat versetzte) mit Mineralsäuren angesäuerte Urin mit Äther extrahiert wird. Der Ätherextrakt wird filtriert; sein Rückstand mit etwas Bisulfitlauge aufgenommen und mit Äther extrahiert. Während die Ketonsäure in der Bisulfitlauge zurückbleibt, gehen die nicht oxydierten Fettsäuren und eventuell vorhandene Alkoholsäuren in den Äther über und können aus diesem gewonnen werden; die Gegenwart von Alkoholsäuren verrät sich in der Regel durch optische Aktivität; die Oxysäuren sind ferner in Wasser meist bedeutend leichter löslich als die Fettsäuren. Die Bisulfitlösung wird

[1]) *O. Neubauer*, Über den Abbau der Aminosäuren im gesunden und kranken Organismus. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. **95**. S. 211 (1909).

[2]) *Blum*, Über den Abbau aromatischer Säuren im menschlichen Organismus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **59**. S. 290 (1908). — *Flatow*, Über den Abbau von Aminosäuren im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **64**. S. 367 (1910). — *Ellinger* und *Kotake*, Synthese der p-Oxymandelsäure und ihr angebliches Vorkommen im Harn bei akuter gelber Leberatrophie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **65**. S. 402 (1910). — *Fromherz*, Über das Verhalten der p-Oxyphenylaminoessigsäure im Tierkörper. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. **70**. S. 351 (1911).

mit überschüssiger Salzsäure auf dem Wasserbad erwärmt und dann die freigewordene Ketonsäure mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wird mit Wasser aufgenommen und mit einer heißen Lösung von salzsaurem Phenylhydrazin in verdünnter Salzsäure versetzt. Man erhält einen kristallinischen Niederschlag des Hydrazons der Phenylglyoxylsäure.

Ein analoges Verfahren führt bei den anderen Ketonsäuren zum Ziel; bei den gut kristallisierenden ist eine Überführung in das Hydrazon nicht nötig.

Eine vorläufige Orientierung über die Gegenwart von α-Ketonsäuren wird ferner durch eine Reihe von Farbenreaktionen ermöglicht:

1. mit Thiophen; versetzt man z. B. eine Lösung von Phenylglyoxylsäure in thiophenhaltigem Benzol mit konzentrierter Schwefelsäure und verdünnt mit destilliertem Wasser, so erhält man eine schön violettrote Färbung *(Claisen)*;

2. Färbung mit $FeCl_3$: Phenylbrenztraubensäure grün, p-Oxyphenylbrenztraubensäure vorübergehend grün;

3. mit Nitroprussidnatrium: eine wässerige Lösung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure färbt sich bei Zusatz einer Nitroprussidnatriumlösung und Natronlauge rubinrot; beim Ansäuern mit Essigsäure grün.[1])

Auch hier hat die Folgerung, daß die Aminosäuren des natürlichen Eiweißes in analoger Weise zu den Ketonsäuren abgebaut werden, zunächst nur den Wert eines Analogieschlusses. Aber auch hier ergibt sich eine weitere Stütze für diese Anschauung, und zwar aus dem Studium des Verhaltens der Tyrosinabkömmlinge bei der Alkaptonurie.[2])

Durch Tierversuche mit körperfremden Substanzen ist es ferner *Knoop*[3]) zum erstenmal gelungen, die prinzipiell wichtige Frage, ob der Körper imstande ist, Aminosäuren synthetisch aufzubauen, in positivem Sinne zu entscheiden.

Ein Hund erhält im Laufe von 2 Tagen ca. 20 *g* Benzylbrenztraubensäure $C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . CO . COOH$ als Na-Salz subkutan. Aus dem Ätherextrakt des angesäuerten Harns kristallisiert neben Hippursäure und rechtsdrehender α-Oxysäure

$$C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . CHOH . COOH$$

Acetyl-phenylaminobuttersäure

$$C_6H_5 . CH_2 . CH_2 . CHNH (OC . CH_3) . COOH$$

in kleiner Menge (0·44 *g*) aus.

Auch die Gesetze, nach denen im Körper Substanzen mit verzweigter C-Kette und solche mit „doppelten Bindungen" abgebaut werden, sind in erster Linie an körperfremden Substanzen ermittelt worden.

---

[1]) *Jaffé*, siehe bei *Kotake*, Über das Verhalten der p-Oxyphenylmilchsäure und p-Oxyphenylbrenztraubensäure im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **69**. S. 416 (1910).

[2]) *O. Neubauer*, Über den Abbau der Aminosäuren im gesunden und kranken Organismus. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. **95**. S. 211 (1909).

[3]) *Knoop*, Über den physiologischen Abbau der Säuren und die Synthese einer Aminosäure im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **67**. S. 489 (1910). — *Knoop* und *Kerteß*, Das Verhalten der α-Aminosäuren und α-Ketonsäuren im Tierkörper. Ebenda. Bd. **71**. S. 252 (1911).

Paul Ehrlich[1]) hat die subkutane oder intravenöse Injektion von verküpbaren Farbstoffen dazu benützt, um aufzuklären, in welchen Geweben das stärkste S a u e r s t o f f b e d ü r f n i s herrscht, also die ausgiebigsten Oxydationsprozesse stattfinden.

Als geeignet erwies sich das A l i z a r i n b l a u S (käufliches Präparat). Durch Verreiben mit Wasser und Filtrieren wird eine konzentrierte (17%) Lösung hergestellt; von dieser werden erwachsenen Kaninchen etwa 7 *cm*³ (mittlere letale Dosis) subkutan injiziert; nach 15—20 Minuten wird das Tier getötet, seine Organe auf den Farbstoffgehalt untersucht. Durch Verwendung entbluteter Tiere und durch kurzes Einlegen in siedendes Wasser wird die Beurteilung der Farbe erleichtert. Das farblose Reduktionsprodukt des Farbstoffes kann sichtbar gemacht werden, indem man kleine Stückchen der Organe in Lösung von Borax und etwas Chromat einlegt, wodurch das Reduktionsprodukt zum Farbstoff oxydiert wird. Als Stätten des energischesten Reduktionsvermögens, die schon innerhalb des Lebens Alizarinblau reduzieren, erweisen sich: Leber, Nierenrinde, Lunge, *Harder*sche Drüse und ein Teil der glatten Muskulatur (obere Darmpartien).

Ein zweiter von *Ehrlich* verwendeter Farbstoff ist das I n d o p h e n o l, das leichter reduzierbar ist. Es wird als Indophenolweiß verwendet, indem 10 *cm*³ der käuflichen Paste (eine in 40 Teilen wasserlösliche Sn-Verbindung des Leukoindophenols, Fabrik Cassela & Co.) in 140 *cm*³ Wasser und 3—4 *cm*³ Essigsäure unter Erwärmen gelöst, Kaninchen subkutan injiziert werden. Es ist empfehlenswert, der (schmerzhaften) Injektion eine leichte Ätherisierung voranzuschicken. In den Organen des getöteten Tieres ist das Indophenol an der Farbe zu erkennen. Das Leukoindophenol wird sichtbar gemacht durch Einlegen der (frischen oder gekochten) Organe in eine konzentrierte Lösung von neutralem chromsauren Kalium; man findet es in Lungen, Nierenrinde, Magen- und Darmschleimhaut und in der Muskulatur, nur wenig in der Leber.

II. Untersuchungen am kranken Organismus.

Die Untersuchungen am pathologischen Objekt haben sich für die Erkenntnis intermediärer Stoffwechselvorgänge als besonders wichtig erwiesen. Die Beobachtungen am kranken Menschen haben eine große Reihe von Fragestellungen ergeben, deren weitere Verfolgung zu wichtigen Aufklärungen geführt hat.

Bei krankhaften Zuständen treten in den Exkreten, speziell im Harn, häufig Substanzen auf, die normalerweise hier gar nicht oder doch nur in Spuren vorhanden sind. Jede solche Beobachtung gibt Veranlassung, folgende drei Fragen aufzuwerfen.

1. A u s w e l c h e r M u t t e r s u b s t a n z g e h t d e r S t o f f h e r v o r? Die Beantwortung dieser Frage ist, da die pathologischen Produkte in letzter

[1]) *Paul Ehrlich*, Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Berlin 1885.

Linie doch aus Substanzen der Nahrung entstehen, in der Regel verhältnismäßig einfach und sicher durch quantitative Verfolgung der Ausscheidungsverhältnisse bei Änderung der Nahrungszufuhr zu lösen. Vermehrte Zufuhr der Muttersubstanz wird die Menge des pathologischen Produktes in den Exkreten im allgemeinen steigern (Steigerung der Zuckerausscheidung bei Diabetes durch Kohlenhydrat und Eiweiß, der Acetonausscheidung durch Fettzufuhr, der Homogentisinsäureausscheidung durch Eiweißzufuhr). Auch die Zufuhr der intermediären Produkte wird im allgemeinen die gleiche Wirkung haben (Aminosäuren bei Diabetes, Buttersäure bei Acetonurie, p-Oxyphenylbrenztraubensäure bei Alkaptonurie).

Einen absolut zwingenden Beweis für die Auffassung eines Stoffes als Muttersubstanz vermag diese Versuchsanordnung allerdings nicht zu erbringen. Es besteht immer die Möglichkeit, daß die zugeführte Substanz eine Vermehrung in der Ausscheidung des pathologischen Produktes auf indirektem Wege verursacht. So steigert Zufuhr von Schilddrüsensubstanz durch Erhöhung des Eiweißzerfalls die Ausscheidung der Homogentisinsäure (nicht veröffentlichte Versuche des Referenten). Es ist auch der Fall denkbar, daß ein eingeführter Stoff einen anderen Bestandteil des Körpers vor der normalen vollständigen Zersetzung schützt, so daß eine größere Menge des unvollständig zersetzten pathologischen Körpers im Harn erscheint. So hat *Pflüger* [1]) versucht, die Zuckerausscheidung, die *Külz* bei einem mit Kasein ernährten Diabetiker beobachtete, auf eine derartige zuckersparende Wirkung des Eiweißes zurückzuführen. Doch hat sich bis jetzt noch in keinem Falle diese Erklärung als wahrscheinlich erweisen lassen.

Die Annahme eines direkten Überganges einer zugeführten Substanz in das pathologische Endprodukt erscheint dann besonders gestützt, wenn einfache quantitative Beziehungen zwischen der Menge der zugeführten und der ausgeschiedenen Substanz bestehen. Unter Umständen, wie bei der Alkaptonurie und beim maximalen Diabetes, ist die Stoffwechselstörung eine absolute: die Menge des ausgeschiedenen pathologischen Produktes entspricht der Menge der eingeführten Substanz.

Bei einzelnen Stoffen versagt diese Methode, indem die Menge des ausgeschiedenen Produktes sich als unabhängig von der Ernährung erweist (Pentosurie, *Bence-Jones*scher Eiweißkörper). Das erscheint verständlich, denn eine eingeführte Substanz muß ja nicht sofort der Zersetzung anheimfallen, sondern kann — unverändert oder verändert — zur Ablagerung kommen. Ferner kann es sein, daß ein pathologisches Produkt nur aus der Zersetzung von Gewebssubstanz hervorgeht, also nur ein Produkt des endogenen Stoffwechsels ist.

Als 2. Frage ist zu beantworten, ob der betreffende Stoff auch normalerweise aus dieser Muttersubstanz entsteht, ob er also ein physiologisches Zwischenprodukt ist, das nur infolge einer Hemmung nor-

---

[1]) *Pflüger,* Glykogen. Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **96**. S. 373 (1903).

maler Stoffwechselprozesse nicht zur weiteren Verarbeitung kommt, oder ob schon seine Bildung Ausdruck einer pathologischen Veränderung, einer „Perversität" des Stoffwechsels ist. Zur Lösung dieser Frage sind Untersuchungen am normalen Organismus nötig.

3. Ist das Produkt als intermediäres Produkt des normalen Stoffwechsels erkannt, so ergibt sich die weitere Frage, *wie es beim Gesunden weiter zu den Endprodukten verarbeitet wird.* Auch diese Frage muß am gesunden Organismus oder bei pathologischen Zuständen anderer Art studiert werden. Ist dagegen das ausgeschiedene Produkt als ein schon seiner Entstehung nach pathologisches Produkt erkannt, so muß entschieden werden, *an welchem Punkte die pathologische Veränderung des Stoffwechsels eingesetzt hat.*

Nicht selten erscheinen gleichzeitig *mehrere* pathologische Produkte im Harn, z. B. Acetonkörper. Dann ist außer den besprochenen Fragen die genetische Beziehung dieser Substanzen untereinander aufzuklären.

A. Glykosurie (Diabetes melitus).

Die dauernde Traubenzuckerausscheidung des Menschen, der *natürliche Diabetes melitus*, ist diejenige Krankheit, die zuerst zum Studium des intermediären Stoffwechsels in ausgedehntem Maße herangezogen worden ist. Er hat die Anregung gegeben zum Studium der Frage nach den Muttersubstanzen des Traubenzuckers im Organismus. Es wurde dabei an zwei alte ärztliche Erfahrungstatsachen angeknüpft: daß die Glukoseausscheidung der Diabetiker in erster Linie abhängig ist von der Zufuhr zuckerhaltiger oder stärkehaltiger Nahrungsmittel, daß ferner manche Diabetiker („schwere Form" *Seegens*) auch bei kohlenhydratfreier Fleischfettkost noch beträchtliche Mengen von Zucker ausscheiden; davon spricht schon *Claude Bernard* als von einer altbekannten Tatsache. Die erstgenannte Beobachtung hat Veranlassung gegeben, den Übergang verschiedener Kohlenhydrate in Traubenzucker exakt nachzuweisen. Die zweite hat immer wieder zu der Überzeugung gedrängt, daß Zucker im Körper auch aus nicht zuckerartigen Substanzen entstehen kann.

Nicht alle Fälle von menschlichem Diabetes sind für derartige Untersuchungen geeignet. Wenig geeignet sind ganz leichte Fälle, bei denen nur geringe Ausschläge zu erwarten sind, andrerseits aber auch ganz schwere Fälle, bei welchen eine für die Zwecke des Versuches berechnete Kost dem Patienten nachteilig sein könnte; vor allem Fälle mit bedeutenderen Komplikationen, wie Fieber, schwerer Tuberkulose, Verdauungsstörungen, Nephritis, ferner alle psychisch sehr erregbaren Menschen. Ferner sind diejenigen Menschen auszuschalten, bei welchen sich die Zuckerausscheidung als relativ unabhängig von der Art der Ernährung erweist; ferner alle Fälle, bei welchen sie häufige, scheinbar unmotivierte Schwankungen aufweist.

Wie bei anderen Stoffwechselversuchen ist auch hier eine Vorperiode, eine Hauptperiode und eine Nachperiode zu untersuchen. Während der

ganzen Zeit bekommt der Patient eine möglichst gleichmäßige Diät. Um möglichst starke Ausschläge zu erhalten, ist es zweckmäßig, eine Diät zu reichen, bei welcher die Zuckerausscheidung der Vorperiode und Nachperiode niedrig ist, also eine kohlenhydratarme, abgewogene Fleischfettkost. Da nur wenige Menschen eine absolut gleichartige Fleischfettkost durch längere Zeit ohne Appetitstörungen ertragen, so wird man meist einen gewissen Wechsel z. B. in der Art des Fleisches, des Käses, des Salates gestatten müssen: geringe Mengen kohlenhydratarmen Gemüses wird man dem Patienten schon wegen der sonst drohenden Obstipation meist zubilligen müssen, in manchen Fällen auch eine geringe Menge von Weißbrot oder von Milch. Der Kalorienwert soll dem Bedürfnis des Patienten entsprechend gewählt werden, lieber etwas knapp als zu reichlich. Der Kaloriengehalt der Nahrung wird meist aus Tabellen berechnet: N-Gehalt und Kohlenhydratgehalt werden bestimmt. Um dem Patienten die Lockungen der Diätsünde zu ersparen, um eine genügende Kontrolle ausüben zu können und zur besseren Fernhaltung psychischer Insulte ist eine Isolierung in Einzelzimmern dringend zu raten. Muskelanstrengungen sind zu vermeiden. Bettruhe nicht unzweckmäßig. Differente Medikamente sollen womöglich nicht gegeben werden: Natron, wenn nötig, in täglich genau gleicher Menge. In prinzipiell wichtigen Versuchen ist eine Überwachung der Diät durch den Arzt selbst geboten, wenn auch das Mißtrauen, das *Pflüger* und *Cremer* den zuckerkranken Menschen entgegenbringen, wohl etwas zu weit geht. Tägliche Wägungen und Temperaturmessungen sind selbstverständlich. Das Wohlbefinden des Patienten ist dauernd zu kontrollieren: besondere Aufmerksamkeit ist dem Stuhlgang zuzuwenden, der bei solch gleichmäßiger Kost häufig Neigung zur Verstopfung, zuweilen auch zu Diarrhöen zeigt.

Die Vorperiode hat so lange anzudauern, bis die Zuckerausscheidung (polarimetrisch und titrimetrisch bestimmt) sich auf ein gewisses Niveau eingestellt hat. Der Urin wird in 24stündigen Perioden, die am Morgen beginnen, gesammelt. Außer der Zuckerausscheidung und dem spezifischen Gewicht ist in jedem Falle auch der N zu bestimmen, dessen Ausscheidung ebenfalls konstant werden muß. Am besten ist es, wenn sich N-Gleichgewicht erzielen läßt.

Wichtig ist es, besonders dann, wenn die Versuche mit N-haltigem Material gemacht werden sollen, auch den N-Gehalt des Kotes zu kontrollieren (siehe dieses Werk, Bd. 5, I. Teil, S. 341). Ferner ist es zweckmäßig, möglichst viele andere Urinbestandteile zu bestimmen; so bei gleichzeitiger Azidose Aceton und Oxybuttersäure; ferner NH_3, die Chloride, Phosphate usw. (siehe dieses Werk, Bd. 5, I. Teil, S. 281). Je mehr Harnbestandteile bestimmt werden, und je gleichmäßiger ihre Ausscheidung verläuft, desto sicherer sind die Resultate des Versuches verwertbar.

Während der Hauptperiode wird dem Patienten zu seiner Standardkost die auf Übergang in Zucker zu prüfende Substanz zugelegt (superponiert); oder sie wird, speziell wenn es sich um Untersuchung ver-

schiedener Eiweißarten handelt, an Stelle eines in der Standardkost enthaltenen Nahrungsteiles gegeben (substituiert). Diese Versuchsanordnung hat den Vorteil, daß dabei eine Änderung der Kalorienzufuhr, die an und für sich eine Änderung in der Ausscheidung des Zuckers herbeiführen könnte, vermieden wird; die Superpositionsmethode ergibt dagegen häufig stärkere Ausschläge. Die Hauptperiode dauert einen oder, was bei weitem vorzuziehen ist, zwei oder mehrere Tage; bei eintägiger Dauer spricht die Nachwirkung des vorhergehenden Tages zu sehr mit.

Die Nachperiode gleicht der Vorperiode und soll auch dieselben Werte für die Ausscheidungsprodukte liefern. Auch sie soll möglichst lang sein, ein Tag ist auf jeden Fall ungenügend.

In der Literatur findet sich nur eine verschwindend kleine Anzahl von Versuchen an menschlichen Diabetikern, die nach diesen strengen Anforderungen angestellt und völlig glatt verlaufen sind, so daß es kaum möglich ist, einen Versuch anzuführen, der als Musterbeispiel dienen kann. Das liegt in der Regel nicht an den Untersuchern, sondern an der Schwierigkeit des zu untersuchenden Objektes. Die Perioden gleichmäßiger Kost können mit Rücksicht auf die Patienten oft nicht so lange ausgedehnt werden, wie es wünschenswert wäre. Appetitlosigkeit, Magen- und Darmstörungen, mangelnde Geduld des Patienten sind häufige Ursachen, daß die Versuche vorzeitig abgebrochen werden müssen. In anderen Fällen treten ganz unmotivierte Schwankungen der Zuckerausscheidung ein, so daß eine Konstanz nicht zu erzielen ist. Ungemein häufig ändert sich im Verlaufe eines Versuches — häufig wohl sogar als Folge des Versuches — die Toleranz des Patienten für Kohlenhydrate, so daß die Nachperiode nicht mehr dieselben Werte liefert wie die Vorperiode. In vielen Fällen treten in einzelnen Versuchsperioden sehr erhebliche Retentionen oder auch Ausschwemmungen von N ein, die ihrer Natur nach noch völlig rätselhaft sind. Es ist klar, daß bei der Deutung derartiger Versuche, besonders bei der Berechnung des Quotienten $\frac{D}{N}$ (s. unten), große Vorsicht nötig ist. Dazu kommt, daß der Diabetes des Menschen offenbar keine einheitliche Krankheit vorstellt, so daß derselbe Eingriff in verschiedenen Fällen häufig verschieden wirkt. Ferner kommen individuelle Verschiedenheiten in Betracht. Anspruch auf allgemeine Gültigkeit können also nur Versuchsresultate haben, welche an einer Reihe verschiedener Fälle in einwandfreier Weise gewonnen sind.

So kommt es, daß nur wenige an menschlichen Diabetikern angestellte Versuche wirklich beweiskräftig sind, besonders in quantitativer Hinsicht. Deswegen sind sie aber keineswegs wertlos. Sie liefern zum mindesten wichtige Anregungen, die dann durch exakt auszuführende Untersuchungen am experimentellen Diabetes des Tieres gesichert werden können. Man muß sich nur hüten, aus unvollkommenen Versuchen bindende Gesetze ableiten zu wollen. Andrerseits kann angemerkt werden, daß die beim menschlichen Diabetes gewonnenen Erfahrungen durch die Versuche am Tier so gut wie immer Bestätigung erfahren haben.

Derartige Versuche beim schweren menschlichen Diabetes zeigen immer wieder, daß auch bei nahezu völligem Ausschluß der Kohlenhydrate aus der Kost erhebliche Mengen von Zucker im Harn ausgeschieden werden können. Dieser Zucker muß, da große Kohlenhydratdepots im Körper nicht zur Verfügung stehen, aus nicht kohlenhydratartigem Material stammen. Da als solche Zuckerquelle offenbar in erster Linie das Eiweiß in Betracht kommt, so pflegt man nach *Minkowski* diesen nicht aus zugeführtem Kohlenhydrat stammenden Zucker (D) zu dem gleichzeitig im Harn erscheinenden N, der als Maß für die gleichzeitig zersetzte Eiweißmenge angenommen wird, in Beziehung zu setzen. Die Berechnung dieses wichtigen Quotienten $\frac{D}{N}$ geschieht bei Hungernden oder vollständig kohlenhydratfrei Ernährten einfach durch Einsetzung der im Harn gefundenen Werte für Zucker und Stickstoff. Wenn dagegen mit der Nahrung Kohlenhydrate aufgenommen worden sind, so wird deren Menge von der im Harn gefundenen abgezogen. Man macht also bei der Berechnung dieses Faktors drei Annahmen:

1. daß die Kohlenhydrate der Nahrung quantitativ im Harn wieder erscheinen; das wird in der Regel nicht zutreffen, da ein absoluter Diabetes beim Menschen jedenfalls zu den Seltenheiten gehört. Infolgedessen wird der berechnete Quotient meist etwas zu niedrig ausfallen. Der Fehler wird natürlich um so geringer sein, je geringer die Menge der zugeführten Kohlenhydrate ist, er kommt bei Fleischfettkost kaum in Betracht. Daraus ergibt sich, daß die Berechnung um so richtiger ist, je weniger Kohlenhydrate die Standardkost enthält.

2. daß keine Kohlenhydrate ausgeschieden werden, die aus den aufgespeicherten Kohlenhydratvorräten des Körpers stammen. Der Einwand, daß diese Annahme nicht zulässig ist, ist namentlich von *Pflüger* immer wieder betont worden. Er trifft besonders kurzdauernde Versuche. Gewisse Glykogenvorräte sind auch beim schweren Diabetes immer vorhanden[1]; doch dürften sie nicht ausreichen, um durch längere Perioden Harnzucker zu liefern. Wegen dieser Fehlerquelle ist es zweckmäßig, schon längere Zeit vor dem Versuch den Patienten mit möglichst kohlenhydratarmer Kost zu ernähren.

3. daß die N-Menge des Harns wirklich der Menge des zersetzten Eiweißes entspricht. Diese Annahme, deren Richtigkeit für den Gesunden nicht bezweifelt werden kann, trifft beim Zuckerkranken wahrscheinlich nicht immer zu. Häufig wird die Beobachtung gemacht, daß bei Diabetikern während langer Perioden N retiniert wird, und zwar augenscheinlich nicht in Form von Eiweiß, bis zu 25 *g* pro Tag.[2]) Perioden solcher N-Re-

[1]) *Naunyn*, Der Diabetes melitus in *Nothnagels* Spezielle Pathologie und Therapie. 1898. S. 158.

[2]) *Lüthje*, Kasuistisches zur Klinik und zum Stoffwechsel des Diabetes melitus. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **43**. S. 229 (1901).

tentionen werden für den Quotienten $\frac{D}{N}$ fälschlich einen zu hohen Wert ergeben. Deswegen hat dieser Quotient bei Bestehen von N-Gleichgewicht eine größere Sicherheit. Auch Perioden von N-Ausschwemmung kommen vor. Ferner ist es bekannt, daß der N der Nahrung langsamer ausgeschieden wird als der aus der Nahrung stammende Zucker. Man wird deshalb den Quotienten $\frac{D}{N}$ niemals für kurze Perioden berechnen dürfen.

Unter der Annahme, daß der gesamte C des im Körper zersetzten Eiweißes als Traubenzucker im Harn erscheint, kann man für den Quotienten $\frac{D}{N}$ den Maximalwert 8·27 berechnen. Es könnten also bei kohlenhydratfreier Kost für je 1 *g* ausgeschiedenen N 8·3 *g* Harnzucker auf Eiweiß zurückgeführt werden. Die Autoren rechnen aber mit *Mering* von dem Eiweiß-C denjenigen Teil ab, der zur Bildung von Harnstoff nötig ist, also auf 2 N 1 C. Dann erniedrigt sich der durch die Eiweißzersetzung erklärbare Wert auf 7·2; jedoch muß darauf hingewiesen werden, daß der zur Harnstoffbildung nötige C ja sehr wohl der Zersetzung der Fette entstammen könnte.

Andrerseits ist es sehr wenig wahrscheinlich, daß der gesamte C des Eiweißes zu Kohlenhydrat umgebildet werden kann. So muß hervorgehoben werden, daß in diesen schweren Fällen von menschlichem Diabetes ganz regelmäßig auch erhebliche Mengen von Acetonkörpern aus dem Eiweiß hervorgehen. Ferner dürfte ein Teil des abgebauten Eiweißes im Körper noch andere, für den Fortbestand des Lebens unerläßliche Funktionen zu erfüllen haben.[1]) Man ist ziemlich allgemein zu der Annahme gekommen, daß ein Wert für $\frac{D}{N}$, der größer ist als 5, darauf hinweisen würde, daß Zucker auch aus anderweitigem Material als aus Eiweiß hervorgegangen sein muß (Fett!).[2]) Solche höhere Werte sind zwar von verschiedenen Autoren beobachtet, aber in der Regel nicht in längeren Perioden und unter Verhältnissen, unter denen eine vollständige Ausscheidung des aus dem Eiweiß stammenden N nicht garantiert ist.[3])

[1]) *Landergren*, Untersuchungen über den Eiweißumsatz des Menschen. Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. **14**. S. 112 (1903).

[2]) S. auch *Rubner*, Die Gesetze des Energieverbrauchs bei der Ernährung. Leipzig und Wien. 1902. S. 383. — *Falta*, Über die Gesetze der Zuckerausscheidung beim Diabetes melitus. VI. Mitt. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **65**. S. 463 (1908). — Keinesfalls ist es gestattet, den von *Minkowski* für den hungernden oder mit Fleisch gefütterten pankreas-diabetischen Hund gefundenen Quotienten $\frac{D}{N}$ = 2·8 zur Deutung von Stoffwechselversuchen an menschlichen Diabetikern heranzuziehen.

[3]) *F. Müller*, Beiträge zur Kenntnis des Mucins und einiger damit verbundener Eiweißstoffe. Zeitschr. f. Biol. Bd. **42**. S. 538 (1910).

Die Verwertung des Quotienten $\frac{D}{N}$ ist also nur verläßlich bei einer nahezu oder völlig kohlenhydratfreien Kost, bei Berechnung aus genügend langen Versuchsperioden und bei bestehendem Stickstoffgleichgewicht.

Werden nun in der Hauptperiode des Versuches verschiedene Substanzen zur Standardkost zugelegt, so wird sich ein Übergang in Zucker in einer Steigerung der Zuckerwerte und eventuell auch in einer Veränderung des Verhältnisses $\frac{D}{N}$ geltend machen.

Zufuhr von Kohlenhydraten führt in der Regel zu einer erheblichen Steigerung der Traubenzuckerausscheidung. Der Quotient $\frac{D}{N}$ steigt dabei, wenn von der ausgeschiedenen Traubenzuckermenge nun auch das neu zugeführte Kohlenhydrat abgezogen wird, nicht, ja er wird sogar, wenn der Diabetes kein absoluter ist, sinken müssen.

Bei Zufuhr von nicht kohlenhydratartigen N-freien Substanzen wird, wenn ein Übergang in Traubenzucker im Organismus stattfindet, eine Steigerung nicht nur der Zuckerausscheidung, sondern auch des Quotienten $\frac{D}{N}$ eintreten (Milchsäure, Glyzerin). Fett hat in solchen Fällen fast immer negative Resultate ergeben.[1]) Ein strikter Beweis dafür, daß Fett nicht in Zucker übergeht, kann daraus aber nicht abgeleitet werden; denn die Größe des Fettabbaues ist im allgemeinen von der Größe der Fettzufuhr unabhängig. Die Erfahrungen bei der Untersuchung der Acetonkörperausscheidung scheinen allerdings zu zeigen, daß diese Unabhängigkeit keine absolute ist.

Zufuhr von Eiweißkörpern ergibt bei schweren Fällen von Diabetes regelmäßig eine Steigerung der Zuckerausscheidung; verschiedene Eiweißarten wirken verschieden stark.[2]) Da auch die N-Ausscheidung steigt, so kann der Quotient $\frac{D}{N}$ unverändert bleiben. Er kann aber auch geringe Änderungen nach der einen oder nach der anderen Seite darbieten. Man hat auch versucht, einen Ausdruck für die aus dem zugeführten Eiweiß stammende Zuckermenge zu gewinnen, indem man den Quotienten Mehr ausgeschiedener Traubenzucker: Mehr ausgeschiedener N als $\frac{D_1}{N_1}$ berechnet hat. Es ist aber klar, daß bei nicht völlig idealer Gleichmäßigkeit der ausgeschiedenen Mengen eine derartige Berechnung so zahlreiche Fehlerquellen hat, daß ihr kein besonderer Wert beigemessen werden kann.

---

[1]) *Lüthje*, Stoffwechselversuch an einem Diabetiker mit besonderer Berücksichtigung der Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß und Fett. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **39**. S. 425 (1900).

[2]) *Falta*, Über die Gesetze der Zuckerausscheidung beim Diabetes melitus. I. Mitt. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **61**. S. 297 (1907).

Eine Steigerung der Zuckerausscheidung und auch eine Erhöhung des Quotienten $\frac{D}{N}$ beweist noch nicht absolut einen Übergang der gebildeten Substanz in Zucker. Die zugeführte Substanz kann auch indirekt gewirkt haben, z. B. durch Beeinflussung der diabetischen Stoffwechselstörung. Bei den Eiweißversuchen spricht der oft beinahe völlige Parallelismus der Menge des zersetzten Eiweißes und der ausgeschiedenen D-Menge entschieden für einen direkten Übergang.

Manche Autoren berechnen den Quotienten $\frac{D}{N}$ in anderer Weise. Auf Grundlage der Untersuchungen von *Kumagawa* und *Miura* und von *Landergren*[1]) hält *Gigon*[2]) die Annahme für berechtigt, daß ein gewisser Teil des zersetzten Eiweißes im Organismus eine zur Erhaltung des Lebens unbedingt notwendige Funktion zu erfüllen hat und infolgedessen für die Zuckerbildung nicht disponibel ist. Die diesem Teil des Eiweißes entsprechende N-Menge bezeichnet er mit q; nur der Rest, Gesamt-N minus q, kommt für die Zuckerbildung in Betracht. Der Zuckerbildung aus diesem Eiweißanteil entspricht also nicht der Quotient $\frac{D}{N}$, sondern der beträchtlich größere Quotient $\frac{D}{N-q}$. Unter der Annahme, daß für denselben Diabetiker dieser Quotient und das zum Leben notwendige Eiweißminimum q konstante Werte sind, glaubt *Gigon* diesen Quotienten dadurch ermitteln zu können, daß er in mindestens zwei Perioden mit verschieden starker Eiweißzersetzung die Werte für Stickstoff und Zucker bestimmt.

$$\frac{D}{N-q} = \frac{D_1}{N_1-q}.$$

Aus dieser Gleichung läßt sich sowohl q als auch der als Ausdruck für die Zuckerbildung aus Eiweiß anzusehende Faktor $\frac{D}{N-q}$ berechnen; $q = \frac{DN_1 - D_1N}{D - D_1}$.

Im allgemeinen dürfte diese Art der Berechnung nicht besonders zu empfehlen sein; denn abgesehen von der Unsicherheit der theoretischen Grundlagen ist die Annahme des Konstantbleibens von q und von $\frac{D}{N-q}$ unter verschiedenen Versuchsbedingungen und während einer längeren Versuchsperiode doch sehr hypothetisch und bringt jedenfalls in die Berechnung ein neues Element zur Unsicherheit.

Da manche Substanzen sehr rasch eine Steigerung der Zuckerausscheidung bewirken, so ist es in bestimmten Fällen möglich und zweckmäßig, in kürzeren als 24stündigen Perioden zu untersuchen, z. B. in 4- und 6stündigen Perioden. Wenn die Substanz morgens gegeben wird, genügt es häufig, nur tagsüber in kürzeren Perioden zu untersuchen, und die Nachtperiode auf 10 oder 12 Stunden auszudehnen. Die einzelnen Perioden sind, da die Zuckerausscheidung beim Diabetiker im Laufe eines Tages erhebliche Schwankungen zeigt, nicht untereinander, sondern mit den entsprechenden Perioden der Normaltage (Vortag, Nachtag) zu vergleichen.

---

[1]) *Landergren*, Untersuchungen über den Eiweißumsatz des Menschen. Skandinavisches Archiv für die Physiologie. Bd. 14. S. 112 (1903).

[2]) *Gigon*, Die Menge des aus Eiweiß entstehenden Zuckers beim Diabetes. Deutsches Archiv für klinische Medizin. Bd. 96. S. 376 (1909). (A. a. S. 381 hat sich ein Druckfehler eingeschlichen: statt q = 3·4 muß es heißen q = 12·4. Die oben gegebene Darstellung des Gedankenganges ist gegenüber *Gigons* Darstellung etwas vereinfacht.)

Diese Versuchsanordnung liefert häufig größere Ausschläge und verlangt im allgemeinen eine kürzere Versuchsdauer. Andrerseits besteht der Nachteil, daß die Analysen sich an den Versuchstagen häufen. Als Beispiel sei auf eine Versuchsreihe *Gigons* mit verschiedenen Kohlenhydraten und mit Kasein hingewiesen.[1]) Eine Berechnung des Faktors $\frac{D}{N}$ ist für so kurze Perioden natürlich nicht statthaft.

Die experimentell beim Tier erzeugten Diabetesformen vermeiden den größten Teil der Fehlerquellen, welche den Versuchen beim spontanen menschlichen Diabetes anhaften. Der Experimentator ist imstande, eine ihrer Art und ihrem Grade nach immer gleichmäßige Krankheit zu erzeugen, welche — wenigstens beim Phlorhizindiabetes und beim Pankreasdiabetes[2]) — einer maximalen Störung zum mindesten nahekommt. Spontane Schwankungen der Toleranz wie beim menschlichen Diabetes finden in der Regel nicht statt. Die Überwachung ist einfacher; doch soll auch hier die Kontrolle womöglich durch Männer der Wissenschaft ausgeübt, nicht unverläßlichen Wärtern anvertraut werden. Die Individualität des Versuchsobjektes spielt eine geringere Rolle; die psychische Beeinflussung und die Rücksicht auf das Wohlbefinden des kranken Menschen kommen in Wegfall. Die Ernährung kann eine sehr viel gleichmäßigere und einfachere sein; es gelingt, die verschiedenen Nährstoffe in fast reiner Form zuzuführen. Die einzelnen Perioden können länger gewählt werden, Vor- und Nachperiode können als Hungerperiode eingerichtet werden, wobei der Einfluß einer in der Hauptperiode gegebenen Substanz natürlich viel augenfälliger hervortritt. Man kann ferner dem Versuch eine Behandlung vorausschicken, bei welcher der vorhandene Glykogenvorrat fast völlig zum Schwinden gebracht wird (Hunger, Arbeit usw., s. oben S. 1162). Nach Abschluß des Versuches kann das Tier getötet werden, und man kann sich durch Untersuchung der Organe Aufklärung über die vorhandenen Kohlenhydratdepots verschaffen. Die quantitative Abgrenzung des Urins ist genauer durchzuführen (Katheterismus mit anschließender Ausspülung der Blase mit Trikresollösung).

Es soll nicht verschwiegen werden, daß Untersuchungen beim experimentellen Diabetes des Tieres gegenüber den Untersuchungen am Diabetes des Menschen auch manche Nachteile haben. Sowohl beim Pankreas- wie beim Phlorhizindiabetes besteht (im Gegensatz zum schweren Diabetes des Menschen) nicht bloß eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels, sondern auch eine beträchtliche Steigerung des Eiweißzerfalles. Ferner sind am Tier gewonnene Resultate nicht ohne weiteres auf den menschlichen Organismus, dessen Stoffwechselgesetze doch am meisten interessieren,

---

[1]) *Falta* und *Gigon*, Über die Gesetze der Zuckerausscheidung beim Diabetes melitus. II. Mitteilung. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **61**. S. 338 (1907).

[2]) Die anderen Arten des experimentellen Diabetes kommen für experimentelle Zwecke kaum in Betracht. (CO-Diabetes s. weiter unten.)

übertragbar. Man darf ferner nicht vergessen, daß auch die Formen des experimentellen Diabetes ihrem Wesen nach noch ungeklärt sind.

Die eine Hauptform des experimentellen Diabetes, die zur Lösung von Stoffwechselfragen vielfach Verwendung gefunden hat, ist der von *Mering* und *Minkowski* entdeckte Pankreasdiabetes.[1]) Fast alle Versuche wurden am Hund ausgeführt. Die Methode der Pankreasexstirpation beim Hund ist wiederholt genau beschrieben worden.[2]) Es ist notwendig, nach dem Tode durch Sektion des Versuchstieres die Vollständigkeit der Exstirpation zu kontrollieren. Einige Tage nach der Operation kann, wenn die Pankreasexstirpation eine totale ist, der Versuch begonnen werden.

Im übrigen ist die Anlage des Versuches so wie beim Diabetes des Menschen. Temperaturmessung darf nicht vergessen werden. Die Versuche können bei völligem Hunger durchgeführt werden; will man die Tiere aber einige Zeit am Leben erhalten, so müssen sie gefüttert werden, und zwar ist es für die Versuchszwecke im allgemeinen geboten, sie mit möglichst reinem Eiweiß zu füttern. Als kohlenhydratarme Nahrung empfiehlt sich Rindfleisch oder nach *Pflüger* besonders Kabliaufleisch (s. oben S. 1162); der Kohlenhydratgehalt ist jedesmal besonders zu bestimmen. Das Eiweiß wird infolge Mangels des Pankreassekretes nur schlecht ausgenützt. *Sandmeyer*[3]) hat gezeigt, daß man die Verwertung des Fleisches durch gleichzeitige Verfütterung von rohem Pankreas bedeutend verbessern kann. Pankreas ist gewöhnlich glykogenfrei. Will man das im Pankreas meist reichlich vorhandene Fett vermeiden, so gibt man dem Tiere einen kalt hergestellten Pankreasaufguß. Auch Kaseinpräparate, z. B. Nutrose, kann man zur Ernährung verwenden.[4]) Auch diese Präparate sind auf die Abwesenheit von Kohlenhydraten zu prüfen. Beigemengtes Fett kann durch Ätherextraktion entfernt werden. Durch Zusatz von Fleischextrakt oder Fett kann die Nutrose schmackhafter gemacht werden. Eventuell kann die

---

[1]) *Mering* und *Minkowski*, Diabetes melitus nach Pankreasexstirpation. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **26**. S. 371 (1889).

[2]) *Minkowski*, Untersuchungen über den Diabetes melitus nach Exstirpation des Pankreas. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **31**. S. 85 (1893). — *Witzel*, Die Technik der Pankreasexstirpation beim Hund. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **106**. S. 173 (1905). Die vollständige Exstirpation des Pankreas bietet für die Versuche den Vorteil, daß die Störung des Zuckerstoffwechsels den höchsten Grad erreicht. Doch überleben die Tiere diese Operation meist nur 2—4 Wochen, während welcher die Tiere auch noch unter dem Einflusse der Wunde stehen. (Eiterungen.) Länger dauernde Versuche kann man an Tieren ausführen, welchen man nach *Sandmeyer* (Über die Folgen der partiellen Pankreasexstirpation beim Hund. Zeitschr. f. Biol. Bd. **31**. S. 12 [1895]) nur den größten Teil des Pankreas exstirpiert hat. Der Diabetes tritt hier erst später infolge anschließender Atrophie des Restes ein, zu einer Zeit, zu der sich die Tiere von der Operation bereits völlig erholt haben. Sie können oft mehrere Monate am Leben gehalten werden.

[3]) *Sandmeyer*, Über die Folgen der partiellen Pankreasexstirpation beim Hund. Zeitschr. f. Biol. Bd. **31**. S. 12 (1895).

[4]) Über die Herstellung einer kalten Nutrosesuppe siehe *Pflüger*, Ursprung des im Pankreasdiabetes ausgeschiedenen Zuckers. Arch. f. d. ges. Physiologie. Bd. **108**. S. 123 (1905).

Nahrung mit der Schlundsonde beigebracht werden; das Erbrechen, das sich nachher leicht einstellt, kann man häufig durch Beschäftigung mit dem Tiere, Fütterung beim Stehen auf den Hinterfüßen usw., verhindern. Der N-Gehalt der Nahrung soll bestimmt werden.

Durch längerdauernde Fütterung mit möglichst reiner Eiweißnahrung gelingt es festzustellen, daß Zucker im Körper aus nicht zuckerartigem Material entsteht. Dieser Beweis ist dann erbracht, wenn die ausgeschiedene Zuckermenge größer ist, als die zugeführten Kohlenhydrate und die Zuckervorräte des Körpers ausmachen können; nach *Schöndorff*[1]) kann der Glykogengehalt des Körpers höchstens 40 *g* Glykogen pro Kilogramm Körpergewicht betragen, was 44 *g* Traubenzucker entspricht. In den Versuchen von *Lüthje*[2]) und *Pflüger*[3]) ist es gelungen, diesen Beweis zu erbringen; auf die Tabellen dieser Versuche sei als auf klassische Beispiele für eine richtige Versuchsanordnung verwiesen.

Daß dieser aus Kohlenhydraten nicht ableitbare Zucker höchstwahrscheinlich aus Eiweiß stammt, ist schon deswegen sehr wahrscheinlich, weil die Zuckerausscheidung wie beim menschlichen Diabetes auch beim Pankreasdiabetes mit der N-Ausscheidung parallel geht. Dementsprechend ist der Quotient $\frac{D}{N}$ beim totalen Pankreasdiabetes von *Minkowski* annähernd konstant gefunden worden: etwa 2·8. *Pflüger* hat allerdings immer wieder betont, daß auch in einem Parallelgehen der Zuckerausscheidung mit der N-Ausscheidung kein sicherer Beweis für die Entstehung aus Eiweiß gefunden werden kann; das Eiweiß könne vielleicht nur anregend auf die Zuckerbildung wirken oder den aus anderen Quellen (Fett) stammenden Zucker sparen. Absolut sicher wäre der Beweis nur zu führen, wenn in einem Falle die ausgeschiedene Zuckermenge so groß wäre, daß die gesamte Kohlenhydrat- und Fettvorräte des Körpers und die mit der Nahrung zugeführten Fette zur Erklärung nicht ausreichen. (Aus 100 *g* Fett können theoretisch 192 *g* Traubenzucker entstehen.) Eine so hohe Zuckerausscheidung ist bisher aber noch nicht erzielt worden. (Die definitive, auch von *Pflüger* anerkannte Entscheidung über die Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß wurde mit der Methodik der Glykogenmästung getroffen.)

Als weitere Beispiele für den Übergang von verabreichten Substanzen in Zucker beim Pankreastier seien angeführt: Die Versuche von *Embden* und *Salomon*[4]) mit Aminosäuren; die Untersuchungen von *Min-*

---

[1]) *Schöndorff*, Über den Maximalwert des Gesamtglykogens von Hunden. Arch. f. d. gesamte Physiol. Bd. **99**. S. 191 (1903).

[2]) *Lüthje*, Die Zuckerbildung aus Eiweiß. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **79**. S. 498 (1904); Zur Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **106**. S. 160 (1904).

[3]) *Pflüger*, Ein Beitrag zur Frage nach dem Ursprung des im Pankreasdiabetes ausgeschiedenen Zuckers. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **108**. S. 115 (1905).

[4]) *Embden* und *Salomon*, Über Alaninfütterungsversuche am pankreaslosen Hund. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 5. S. 507 (1904); Fütterungsversuche am pan-

kowski[1]) und *Sandmeyer*[2]) mit verschiedenen Kohlenhydraten; die Untersuchungen *Lüthjes*[3]) mit Glyzerin; der mustergültige, in Tabelle III wiedergegebene Versuch zeigt sehr schön das enorme Ansteigen von $\frac{D}{N}$ auch für eine längere Periode. (Durchschnitt aus einer sechstägigen Periode: 13·0.)[4])

Bezüglich der negativen Ergebnisse der Fettzufuhr gilt das beim Menschendiabetes Gesagte.

Andere Tiere sind für die Pankreasexstirpation weniger geeignet. *Minkowski* hat auch bei einer Katze und bei einem Schwein durch Pankreasexstirpation Diabetes erzielt. Beim Kaninchen sind die anatomischen Verhältnisse sehr ungünstig. Man muß gleichzeitig ein großes Stück des Darmes resezieren; trotzdem stellt sich nur eine vorübergehende Glykosurie ein.

Hédon hat einen dauernden leichten Diabetes bei Kaninchen sich entwickeln sehen, wenn er durch Injektion von Öl in den Ductus Wirsungianus eine allmähliche Atrophie des Pankreas bewirkte.[5])

Bei Vögeln ist der Eintritt eines richtigen Pankreasdiabetes nicht mit Sicherheit zu erzielen.[6])

Auch bei Kaltblütern tritt nach Pankreasexstirpation Diabetes ein, z. B. bei Fröschen; die 24stündige Urinmenge der Frösche wird in der Weise gewonnen, daß die Haut um den Anus mit einer Pinzette hochgehoben und dann mit einem dicken, weichen Faden abgebunden wird; nach 24 Stunden wird die Ligatur entfernt. Für physiologische Versuche ist der Pankreasdiabetes der Frösche wenig geeignet. Auch Schildkröten können pankreasdiabetisch gemacht werden.

Die zweite, für experimentelle Untersuchung wichtige Art des Diabetes ist der von *Mering* entdeckte Phlorhizindiabetes.[7]) Daß phlorhizindiabetische Tiere geeignete Versuchsobjekte sind, um den Übergang verfütterter Stoffe in Traubenzucker zu prüfen, haben zuerst *Cremer* und *Ritter*[8]) gefunden.

---

kreaslosen Hund. Ebenda. Bd. 6. S. 63 (1905). — *Almagia* und *Embden*, Über die Zuckerausscheidung pankreasloser Hunde nach Alanindarreichung. Ebenda. Bd. 7. S. 298 (1906).

[1]) *Minkowski*, Untersuchungen über den Diabetes melitus nach Exstirpation des Pankreas. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **31**. S. 85 (1893).

[2]) *Sandmeyer*, Über die Folgen der partiellen Pankreasexstirpation beim Hund. Zeitschr. f. Biol. Bd. **31**. S. 12 (1895).

[3]) *Lüthje*, Die Zuckerbildung aus Glyzerin. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **60**. S. 98 (1904).

[4]) Weitere Literatur siehe bei *Cremer*, Physiologie des Glykogens. Ergebnisse der Physiologie. Bd. **1**. Biochemie. S. 803 (1902).

[5]) *Hédon*, Production du diabète sucré chez le lapin par la destruction du pancréas. La semaine méd. Vol. **13**. p. 144 u. 394 (1893).

[6]) *Weintraud*, Über den Pankreasdiabetes der Vögel. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **34**. S. 303 (1894); *Kanner*, Über den Diabetes melitus der Vögel nach Pankreasexstirpation. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **37**. S. 275 (1896); Der Zuckerverbrauch im Diabetes melitus des Vogels nach Pankreasexstirpation. Ebenda. Bd. **39**. S. 219 (1897).

[7]) *Mering*, Über experimentellen Diabetes. Verhandlungen des 5. Kongresses für innere Medizin. 1886. S. 185.

[8]) *Cremer* und *Ritter*, Phlorhizinversuche am Karenzkaninchen. Zeitschr. f. Biol. Bd. **29**. S. 256 (1892).

Gegenüber dem Pankreasdiabetes bietet der Phlorhizindiabetes eine Reihe von Vorteilen: die Einfachheit der Technik, die Möglichkeit, Tiere zum Versuch zu verwenden, die nicht eine eingreifende und zu allen möglichen Störungen (Abszeßbildung) führende Operation durchgemacht haben, sondern bis zum Beginn des Versuches völlig normal gewesen sind; die Möglichkeit, die Versuche beliebig lange auszudehnen und an demselben Tiere zu wiederholen. Ferner scheint der Phlorhizindiabetes einen höheren Grad von Störung darzubieten als der Pankreasdiabetes (der Quotient $\frac{D}{N}$ ist in der Regel höher). Die Nachteile bestehen in folgendem: der Phlorhizindiabetes weicht in seinem Wesen von dem menschlichen Diabetes offenbar recht weit ab; das Phlorhizin bedingt in größeren Dosen auch noch andere Störungen, Steigerung des Eiweißstoffwechsels, Fettdegeneration der Leber, Durchfälle, Erbrechen, Krämpfe, Nierenerkrankung, Pupillenveränderung, plötzlichen Tod; an den Injektionsstellen treten häufig Abszesse auf, die zu Störungen im Wohlbefinden des Tieres führen.

Das Phlorhizin wurde von den meisten Autoren aus der Chemischen Fabrik *Merck* bezogen; die einzelnen Präparate scheinen in ihrer Wirksamkeit voneinander abzuweichen. Manche erzeugen bei den Hunden Tetanus und Tod. Deshalb dürfte es sich empfehlen, jedesmal die Reinheit des Präparates zu prüfen, durch Bestimmung des Schmelzpunktes (108°; erstarrt wieder bei 130° und schmilzt zum zweiten Male bei 170—171°) und der spezifischen Drehung in 97%igem Alkohol. $[\alpha]_D^{22 \cdot 5^0} = -(49\cdot40 + 2\cdot41\ p)^0$.

Eventuell ist das Präparat durch Lösen in Essigäther oder Aceton und Ausfällen mit Chloroform zu reinigen.[1]

Die Phlorhizinversuche werden am besten an **Hunden** ausgeführt. Das Mittel wird subkutan injiziert, in sodaalkalischer oder in alkoholischer Lösung. *Cremer* machte darauf aufmerksam, daß Phlorhizin sich in wässeriger Piperazin- oder Lysidinlösung leicht löst[2]; bei Stoffwechselversuchen wäre in diesem Falle der N-Gehalt des Lösungsmittels zu berücksichtigen. Da nach den Phlorhizininjektionen leicht Abszesse auftreten, so ist vorherige Reinigung der rasierten Haut mit Äther und Verwendung einer ausgekochten Spritze geboten.

Es ist zweckmäßig, die Versuche an Tieren mit „**totalem**" Phlorhizindiabetes anzustellen. Man muß zu diesem Zwecke die Injektionen in relativ kurzen Zeitintervallen wiederholen.[3] *Lusk* hat auf Grund dieser Erkenntnis eine für experimentelle Zwecke geeignete Methode ausgearbeitet: der Hund erhält alle 8 Stunden subkutan 2 *g* Phlorhizin, gelöst in 25 *cm*³ einer

[1]) *Cremer,* Studien über das Phlorhizin und verwandte Körper. Zeitschr. f. Biol. Bd. **36**. S. 123 (1898).

[2]) *Cremer,* a. a. O.

[3]) *Cremer* und *Ritter,* Phlorhizinversuche am Karenzkaninchen. Zeitschr. f. Biol. Bd. **29**. S. 256 (1892).

1%igen Lösung von kohlensaurem Natron von 40°.[1] In der Nacht kann der Zwischenraum zwischen 2 Injektionen 10 Stunden betragen. *Rohmer*[2] gab einem 32 *kg* schweren Hund zweimal täglich 0·9 *g* Phlorhizin in 17%iger alkoholischer Lösung.

Am ersten Tag der Behandlung mit Phlorhizin erfolgt immer eine Ausschwemmung von Zucker aus dem Körper. Viele Autoren finden es zweckmäßig, vor der ersten Injektion oder nach derselben den Glykogengehalt des Körpers möglichst herabzusetzen; zur Verwendung gelangen dabei die oben (S. 1162) bei den Glykogenmästungsversuchen beschriebenen Methoden. *Lusk* empfiehlt, dem Tier am zweiten Tage ein kaltes Bad zu geben und es dann in einem großen kalten Zimmer bei 0° durch 6 Stunden zu lassen, so daß Kälteschauer eintreten; am folgenden Tag kann die Versuchsreihe beginnen. *Pflüger* und *Junkersdorf* geben an, daß man einen 5—10 *kg* schweren Hund durch zehntägiges Hungern, wenn gleichzeitig an den drei letzten Hungertagen je 1 *g* Phlorhizin subkutan gegeben wird, vollständig glykogenfrei machen kann.[3] *Bendix* füttert die Versuchstiere 8 Tage lang mit Fett, läßt sie dann 2 Tage lang hungern, in der Tretmühle Arbeit leisten und injiziert dann alle 6 Stunden Phlorhizin.[4] *Cremer* macht darauf aufmerksam, daß eine vorausgehende Hungerperiode den Nachteil hat, daß nachher leicht N-Retentionen stattfinden.[5]

Der ganze Versuch wird entweder bei vollständigem Hunger durchgeführt oder das Tier erhält eine kohlenhydratfreie Nahrung (s. oben S. 1162).

Als Dauer der einzelnen Versuchsperioden wurde von den Autoren vielfach eine Zeit von 8 oder 12 Stunden gewählt. Für eine verläßliche Berechnung des Quotienten $\frac{D}{N}$ sind jedoch solche Perioden entschieden zu kurz.

Am Ende jeder Versuchsperiode wird die Blase mit dem Katheter entleert und mit 0·2%iger Trikresollösung ausgespült. Bei der Zuckerbestimmung im Harn ist zu beachten, daß die nach der Vergärung zurückbleibende Linksdrehung zur beobachteten Rechtsdrehung addiert werden muß; sie ist bedingt durch die Gegenwart von unverändertem Phlorhizin, Phlorhizin-Glykuronsäure[6], eventuell auch Oxybuttersäure. Kontrolluntersuchungen mittels einer Reduktionsmethode sind unbedingt zu empfehlen.

---

[1]) *Ringer* und *Lusk*, Über die Entstehung von Dextrose aus Aminosäuren bei der Phlorhizinglykosurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **66**. S. 106 (1910).

[2]) *Rohmer*, Über Zuckerbildung aus verschiedenartigem Eiweiß. Zeitschr. f. Biol. Bd. **54**. S. 455 (1910).

[3]) *Pflüger* und *Junkersdorf*, Über die Muttersubstanzen des Glykogens. Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **118**. S. 203 (1910).

[4]) *Bendix*, Über die physiologische Zuckerbildung nach Eiweißdarreichung. Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. **32**. S. 479 (1901).

[5]) *Cremer*, Physiologie des Glykogens. Ergebnisse der Physiologie. Jg. 1. Biochemie. S. 803 (1902).

[6]) *Schüller*, Über Phlorhizin- und Phloretin-Glykuronsäure. Zeitschr. f. Biol. Bd. **56**. S. 274 (1911) (Versuche an Kaninchen).

Aus den D- und N-Werten wird der Quotient $\frac{D}{N}$ berechnet. Die Kautelen sind dabei dieselben wie beim menschlichen Diabetes und beim Pankreasdiabetes (keine zu kurzen Perioden, keine N-Retention). In der Regel beträgt der Quotient bei Hungernden oder mit Fleisch ernährten Phlorhizintieren etwa 3·65; mit manchen Phlorhizinpräparaten soll sich nur ein Quotient von 2·7—3·2 erzielen lassen.[1] Ob der im Phlorhizinmolekül enthaltene Zucker als eingeführtes Kohlenhydrat in Abzug gebracht werden soll, ist strittig.

Andere Versuchstiere: *F. Kraus*[2]) hat Versuche an Katzen angestellt, die täglich 1·2 *g* Phloretin pro Kilogramm Körpergewicht mit der Schlundsonde erhielten. Auch bei Kaninchen kann man durch Phlorhizininjektion Diabetes erzielen.[3]) Doch ist nach *Lusk* und nach *Cremer* dieser Phlorhizindiabetes der Kaninchen nicht so vollständig wie der des Hundes und daher für Versuchszwecke weniger geeignet. Auch gehen Kaninchen häufig an Phlorhizinvergiftung zugrunde. Phloretin ist zur Erzeugung von Glykosurie bei Kaninchen nicht brauchbar.

Hühner bekommen nach Phlorhizininjektion ebenfalls Diabetes.

Cremer schnitt die Rückenhaut von Fröschen mit der Schere ein, brachte Phlorhizin in Substanz in die aufgehobene Tasche und vernähte sie wieder. Der Harn enthielt Zucker. Die wirksame Dosis beträgt $^1/_2$ *mg*; größere Mengen als 50 *mg* führen in wenig Stunden den Tod herbei.[4])

Auch beim Menschen kann man, wie es scheint, durch Phlorhizininjektion ohne Schaden (?) einen längere Zeit dauernden Diabetes unterhalten. Doch ist der menschliche Phlorhizindiabetes zur Untersuchung von Stoffwechselfragen bisher nicht herangezogen worden.

Die Zahl der Versuche, in welchen die Phlorhizinmethode angewendet worden ist, um den Übergang von Substanzen in Zucker darzutun, ist sehr groß. Doch sind durchaus nicht alle Versuche unter Einhaltung der nötigen Kautelen angestellt. Literatur siehe bei *Cremer*, Physiologie des Glykogens. Ergebnisse der Physiologie. Jg. I. Biochemie S. 803 (1902) und bei *Ringer* und *Lusk*, Über die Entstehung von Dextrose aus Aminosäuren bei Phlorhizinglykosurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **66**. S. 106 (1910).

In Verbindung mit anderen Eingriffen (z. B. Phosphorvergiftung) kann der Phlorhizindiabetes vielleicht zur Aufklärung des Zuckerabbaus herangezogen werden (siehe unten).

B. Andere Meliturien.

Die menschliche Pathologie kennt eine Reihe von Zuständen, bei welchen verschiedene Zuckerarten im Harn abgeschieden werden: Fruktose, Galaktose, Saccharose.

[1]) *Ringer* und *Lusk*, Über die Entstehung von Dextrose aus Aminosäuren bei der Phlorhizinglykosurie. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **66**. S. 106 (1910).

[2]) *F. Kraus*, Über die Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß im diabetischen Organismus. Berliner klin. Wochenschr. Jg. 41. S. 4 (1904).

[3]) *Cremer* und *Ritter*, Phlorhizinversuche am Karenzkaninchen. Zeitschr. f. Biol. Bd. **29**. S. 256 (1893).

[4]) *Cremer*, Phlorhizindiabetes beim Frosch. Zeitschr. f. Biol. Bd. **29**. S. 175 (1892). — *[illegible]*, Der Phlorhizindiabetes der Frösche. Archiv f. Anat. u. Physiol. Abteilung f. Physiol. Jg. 1911. S. 437.

Laktose, Pentose usw. Bei Versuchen an solchen Kranken sind etwa dieselben Kautelen zu beobachten wie bei Diabetikern. Doch haben die Untersuchungen an diesen Zuständen zur Aufklärung intermediärer Stoffwechselprozesse bisher kaum etwas beigetragen. Experimentell sind diese Zustände nicht zu erzeugen.

Die interessanteste von diesen Anomalien ist wohl die Pentosurie. Die Menge der ausgeschiedenen i-Arabinose ist von der Nahrung unabhängig; sie entstammt demnach offenbar vollständig dem endogenen Stoffwechsel.[1])

C. Acetonkörperausscheidung.

Unter der Bezeichnung Acetonkörper faßt man nach *Geelmuyden* drei Substanzen zusammen, die ganz regelmäßig gleichzeitig unter pathologischen Verhältnissen in den Exkreten auftreten: Oxybuttersäure, Acetessigsäure, Aceton.

Der größte Teil der Untersuchungen ist an kranken Menschen, speziell an schwer Diabetischen ausgeführt. Bei solchen Patienten treten oft große Mengen dieser Stoffe auf und das ist für die Genauigkeit der quantitativen Bestimmungen von Vorteil. Dem gegenüber stehen allerdings gewisse Schwierigkeiten bei der Heranziehung solcher Kranken zur Lösung von Stoffwechselproblemen (s. oben S. 1201). Die kohlenhydratfreie Diät, welche die günstigsten Versuchsbedingungen herstellen würde, ist bei solchen Kranken häufig undurchführbar: es muß eine gewisse Menge von Kohlenhydraten zugebilligt werden. Sehr häufig ist auch die Darreichung größerer Mengen von Na bicarbonicum während des Versuches im Interesse des Kranken geboten.

Die Acetonkörperausscheidung bei vollständigem Hunger kann beim Menschen aus naheliegenden Gründen nur ausnahmsweise zu Versuchen über den intermediären Stoffwechsel herangezogen werden (Hungerkünstler[2]), Geisteskranke, Ösophagusverschluß).

Zu Untersuchungen geeignet ist ferner die Acetonkörperausscheidung des Gesunden bei kohlenhydratfreier Kost. Diese Form der Acetonurie ist in der Regel nicht so hochgradig wie die der schwer Diabetischen, aber doch manchmal recht beträchtlich. Sie bietet den großen Vorteil, daß die Versuche an — von der einseitigen Ernährung abgesehen — normalen Individuen angestellt werden können, daß infolgedessen Selbstversuche in ausgedehntem Maßstabe anwendbar sind. Die Acetonausscheidung ist hier, da sie von Schwankungen der Kohlenhydratausnutzung unabhängig ist, sehr viel gleichmäßiger als bei Diabetikern. Eine indirekte Wirkung auf die Acetonkörperausscheidung infolge Beeinflussung des Zuckerstoffwechsels durch eingeführte Stoffe kommt in Wegfall. Es bestehen bedeutende individuelle Unterschiede: Kinder und jugendliche Individuen, angeblich auch Fettleibige, neigen zu einem höheren Grade von Acetonkörperproduktion.

---

[1]) *Bial* und *G. Blumenthal*, Beobachtungen und Versuche bei der chronischen Pentosurie. Deutsche med. Wochenschr. Jg. 27. S. 349 (1901).

[2]) *Boenniger* und *Mohr*, Untersuchungen über einige Fragen des Hungerstoffwechsels. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. Bd. 3. S. 675 (1906).

Die Kost soll praktisch frei sein von verwertbaren Kohlenhydraten. Auch die Eiweißzufuhr soll nicht zu groß gewählt werden, weil Eiweißverbrennung die Acetonkörperausscheidung einschränkt. Wieviel Fett mit der Kost zugeführt wird, hängt von dem Zweck des Versuches ab. Handelt es sich um das Studium von Körpern, die die Acetonproduktion voraussichtlich einschränken werden, so ist eine reichliche Fettdarreichung zur Erzielung hoher Werte in der Vor- und Nachperiode zweckmäßig. Wenn umgekehrt eine Steigerung der Acetonproduktion durch einen eingegebenen Stoff nachgewiesen werden soll, so wird man in der Vor- und Nachperiode nicht zu viel Fett nehmen lassen. Für viele Versuche wurde eine dem Energiegehalt nach ungenügende Nahrung gewählt; dann können aber längerdauernde Versuche ohne Störung des Wohlbefindens nicht gut durchgeführt werden; man wird also besser das Kalorienbedürfnis voll decken.

Ein gutes Beispiel für eine reichliche kohlenhydratfreie Kost ist folgendes[1]: Frühstück (9 Uhr 15 Min): mageres Kalbfleisch 150 *g*, Butter 60 *g*, Wasser. Mittag (5 Uhr): mageres Kalbfleisch 150 *g*, Schweizerkäse 60, Butter 60, Schinkenspeck 60, Salat 15, Bordeaux 200. Abend (9 Uhr): magerer Schinken 125, Schweizerkäse 60, Butter 60, Schinkenspeck 60, Bordeaux 100. Das sind in Summa 163 *g* Eiweiß, 306 *g* Fett und 300 cm^3 Wein, entsprechend 3650 Kalorien. Für deutsche Verhältnisse wird man die Zeiten der Nahrungsaufnahme entsprechend verschieben.

Ein Beispiel für eine kohlenhydratfreie Kost mit ungenügender Kalorienzufuhr findet sich bei *Hirschfeld*[2]: 200 *g* Schabefleisch, 6 Eier, 40 *g* Butter, 1 *l* schwarzer Kaffee. Das sind 77 *g* Eiweiß und 72 *g* Fett, entsprechend 987 Kalorien.

Bei einer solchen kohlenhydratfreien Kost stellt sich eine Ausscheidung von Acetonkörpern ein, die im Laufe der nächsten Tage ansteigt. Die Schnelligkeit und Dauer des Anstieges dürfte außer von individuellen Verhältnissen hauptsächlich von dem Kohlenhydratvorrat im Körper abhängen. *Forssner* empfiehlt daher, schon vor der Einführung der konstanten Kost kohlenhydratarme Nahrung zu nehmen, um am Beginn des Versuches durch ausgiebige Muskeltätigkeit die Kohlenhydratvorräte möglichst zu verkleinern. Andrerseits liegt eine Angabe von *v. Noorden* vor, daß gerade brüske Entziehung der Kohlenhydrate eine starke Azidose zur Folge hat. Das Maximum der Acetonausscheidung ist in der Regel am 7. bis 8. Tage erreicht, sie kann aber auch noch bis zum 15. Tage etwas ansteigen. Später pflegt die Stoffwechselstörung, wohl infolge von Angewöhnung, an Intensität wieder abzunehmen. Auf diesen typischen Ablauf der Kurve ist bei der Deutung von Versuchsresultaten Rücksicht zu nehmen; jedenfalls sind die ersten Tage mit ihren rasch sich ändernden Werten zur Anstellung von Versuchen nicht geeignet. Die Lebensweise soll im übrigen möglichst

---

[1]) *G. Forssner*, Über die Einwirkung des Nahrungsfettes auf die Acetonkörperausscheidung. Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. **22**. S. 349 (1909).

[2]) *Hirschfeld*, Beobachtungen über die Acetonurie und das Coma diabeticum. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **31**. S. 212. (1897).

regelmäßig sein. Bettruhe ist nicht nötig, doch sind stärkere Muskelanstrengungen zu meiden.

Die Untersuchung des in 24stündigen Perioden gesammelten Harns hat die Menge der Oxybuttersäure und des Acetons zu ermitteln. Über die Bestimmungsmethoden siehe dieses Werk, III. Band, S. 906.

Der nach den gebräuchlichen Methoden für „Aceton" ermittelte Wert entspricht der Summe des freien Acetons und der Acetessigsäure. Eine getrennte Bestimmung beider ist meist überflüssig. Um einen Wert für die Gesamtmenge der drei pathologischen Produkte im Harn zu erhalten, rechnet man zweckmäßig die „Aceton"-Zahl auf Oxybuttersäure um (ein Teil Aceton entspricht 1·79 Teilen Oxybuttersäure) und addiert sie zu dem für Oxybuttersäure gefundenen Wert: „Gesamtacetonkörper berechnet als Oxybuttersäure". Da Acetonwerte und Oxybuttersäurewerte miteinander ziemlich parallel verlaufen[1], so kontrollieren sie sich gegenseitig. Wenn die Oxybuttersäure durch Polarisation des Ätherextraktes bestimmt wird, so kann man damit — durch Titrieren eines aliquoten Teiles des ätherischen Extraktes — eine Bestimmung der ätherlöslichen Säuren des Urins verbinden: der gefundene Wert wird im allgemeinen mit dem Oxybuttersäuregehalt parallel gehen und gibt eventuell Aufschluß über das Schicksal eingeführter fremder Substanzen.

Eine Bestimmung des Acetons in der Ausatmungsluft wäre wünschenswert, ist aber schwer durchführbar. Man hat vorgeschlagen, im Laufe jeden Tages einige quantitative Stichproben auszuführen[2] und aus dem Mittel die in 24 Stunden ausgeatmete Menge zu berechnen. Doch sind die Schwankungen so groß, daß der Wert solcher Durchschnittszahlen sehr zweifelhaft ist. Jedenfalls dürfen aus derartigen Bestimmungen in der Atmungsluft allein niemals sichere Schlußfolgerungen gezogen werden.

Bestimmungen des N, womöglich auch des NH_3 und der Azidität im Harn sollten nicht unterlassen werden; unter Umständen sind auch N-Bestimmungen im Kot notwendig.

Die Zufuhr der auf ihre Wirkung zu untersuchenden Substanz wird in der Regel per os erfolgen; womöglich soll die Zufuhr am nächsten und am übernächsten Tag wiederholt werden, bis wieder Konstanz der Acetonkörperausscheidung eingetreten ist. Bei der Prüfung schwierig herzustellender oder teurer Substanzen ist eine derartige Ausdehnung der Hauptperiode auf eine längere Zeit leider meist nicht möglich. Sehr häufig müssen Säuren auf ihre Wirksamkeit geprüft werden; sie werden in Form ihrer Na-Salze gegeben; wenn es sich um verbrennbare Säuren handelt, so wird dann im Körper Alkali frei, das an und für sich steigernd auf die

---

[1] *O. Neubauer*, Ein Beitrag zur Kenntnis der diabetischen Azidose. Verhandl. d. 27. Kongresses f. innere Medizin. 1910. S. 560.

[2] Mittels des von *Johannes Müller* beschriebenen und abgebildeten Apparates. Über die Ausscheidung des Acetons und die Bestimmung desselben in der Atemluft und den Hautausdünstungen des Menschen. Arch. f. exp. Pathologie und Pharm. Bd. **40**. S. 351 (1898).

Acetonkörperausscheidung wirken würde. Es ist daher geboten, bei derartigen Versuchen in der Vor- und Nachperiode äquivalente Mengen von Na bicarbonicum zu geben. Die Verfolgung der NH_3-Ausscheidung gibt dann indirekt auch Aufschluß darüber, ob die gereichte Säure im Organismus verbrannt worden ist.

Für manche Untersuchungen hat es sich als zweckmäßig erwiesen, kürzere als 24stündige Perioden zu verwenden. *Forssner* [1]) wählt für seine Acetonbestimmungen am Tage 2stündige Perioden, in der Nacht 8stündige. Zur Bestimmung der Oxybuttersäure, für welche die so gewonnenen geringen Harnportionen natürlich nicht ausreichen, werden entweder die entsprechenden Perioden verschiedener Tage vereinigt, oder sie wird in 24stündigen Perioden bestimmt. (Mischung aliquoter Teile der einzelnen Harnportionen.) Der Urin von 6stündigen Perioden ist übrigens meist auch für Oxybuttersäurebestimmungen ausreichend. Bei der Untersuchung so kurzer Perioden läßt sich nach *Forssner* und nach eigenen Erfahrungen des Ref. der Einfluß der Fettzufuhr in viel schlagenderer Weise nachweisen, als das bei 24stündigen Perioden möglich ist.

Untersuchungen an anderen Arten der pathologischen Acetonurie (Infektionskrankheiten, Darmkrankheiten, Phosphorvergiftung, periodische Acetonurie der Kinder) können, da die Versuchsbedingungen sich nicht genügend gleichmäßig gestalten lassen, höchstens einen orientierenden Wert beanspruchen.

Sehr häufig sind die Ergebnisse der Untersuchungen an Menschen nicht überzeugend, weil die Ausschläge an den Versuchstagen zu gering sind, oder weil bedeutende Schwankungen auch in der Vor- und Nachperiode stattfinden. Besonders gilt das für Versuche an Diabetikern. Viele in der Literatur mitgeteilte Versuche leiden an diesem Übelstande.

Die experimentelle Acetonkörperausscheidung beim Tier ist erst im Laufe der letzten Jahre häufiger verwendet worden. Im allgemeinen kann man beim Versuchstier keine so hohe „Azidose" erzielen wie beim Menschen.

Einfach kohlenhydratfreie Kost ist außer beim Menschen nur noch beim Affen wirksam. [2]) Doch sind Affen — wohl wegen ihres hohen Preises — zu planmäßigen Untersuchungsreihen noch nicht verwendet worden.

Das Schwein reagiert erst auf vollständige Nahrungsentziehung mit Acetonkörperausscheidung.

Bei den übrigen Versuchstieren (Hunde, Kaninchen, Ziegen) ist Hunger allein in der Regel nicht imstande, eine beträchtliche Acetonurie hervorzurufen. (Nach eigenen Erfahrungen des Referenten bestehen, wenigstens bei Hunden, auch hier bedeutende individuelle Verschiedenheiten.) Hier ge-

[1]) *Forssner*, a. a. O. — *Allard*, Über den zeitlichen Ablauf der Azidosekörperausscheidung beim Diabetes. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **57**. S. 1 (1907).

[2]) *Baer*, Verhalten verschiedener Säugetierklassen bei der Kohlenhydratentziehung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **54**. S. 153 (1906).

lingt das erst durch Kombination mit Phlorhizininjektion[1]) oder durch Heranziehen des Pankreasdiabetes. Junge Hunde neigen nach *Blum* mehr zur Acetonausscheidung als ältere.

Baer und *Blum*[2]) geben folgendes Verfahren an: Hunde erhalten nach 3tägigem Hungern bei beliebiger Wasserzufuhr subkutan Phlorhizin. Die Menge wechselt nach der Größe des Tieres und der Stärke der Azidose, die erzielt werden soll. Sie beträgt meist 1·0—1·5 *g* bei Hunden von 5 bis 10 *kg* Körpergewicht. Das Phlorhizin wird in 25 *cm*³ Alkohol gelöst und nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser eingespritzt. Vor der Phlorhizineinspritzung wird der Urin durch Katheterisieren entleert. Am ersten Tag ist die Azidose meist noch sehr schwach. Am dritten Versuchstag werden meist 0·2—0·5 *g* Aceton und 0·3—4·3 *g* Oxybuttersäure ausgeschieden. Vielleicht wird es sich in Zukunft auch hier als zweckmäßiger erweisen, die Injektion zwei- bis dreimal im Tage zu wiederholen, um eine maximale Phlorhizinwirkung zu erhalten. (Siehe oben S. 1210.)

Auch Kaninchen und Ziegen zeigen bei gleichzeitiger Einwirkung von Nahrungsentziehung und Phlorhizininjektion Acetonausscheidung.[3]) Doch gehen die Kaninchen an der Phlorhizinwirkung leicht zugrunde.

Beim Pankreasdiabetes der Hunde kann eine schwere Azidose auftreten: die Tiere können sogar unter dem Bilde eines typischen Coma diabeticum zugrunde gehen.[4]) In anderen Fällen wieder kommt es gar nicht zur Ausscheidung von Acetonkörpern. Die maßgebenden Bedingungen sind noch unaufgeklärt. Zur Untersuchung intermediärer Stoffwechselvorgänge ist diese Form der Acetonkörperausscheidung noch nicht herangezogen worden.

In Versuchen an (nicht zu großen) Tieren kann auch das Aceton der Ausatmungsluft mitbestimmt werden, indem man die Tiere in einen nach Art eines Respirationsapparates gebauten Raum setzt.[5]) Die durchgesaugte Luft wird durch destilliertes Wasser geleitet, in welchem nach Abschluß des Versuches die Acetonmenge direkt nach *Messinger-Huppert* titriert werden kann.

Die Geschichte der Acetonurieforschung bietet eine Reihe von lehrreichen Beispielen dafür, wie die Technik der **Fragestellung** einzurichten ist, um das Vorkommen pathologischer Produkte in den Exkreten zur Aufklärung intermediärer Stoffwechselprozesse zu verwerten.

Die erste Frage ist die nach der **Muttersubstanz der Acetonkörper**. Die Grundlage für ihre Beantwortung liefern 2 Beobachtungen, die von vornherein die Möglichkeit ausschließen lassen, daß die Kohlenhydrate als Quellen dieser Substanzen anzusehen sind; nämlich:

---

[1]) *Geelmuyden*, Über Acetonurie bei Phlorhizinvergiftung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **26**. S. 381 (1898).

[2]) *Baer* und *Blum*, Über die Einwirkung chemischer Substanzen auf die Zuckerausscheidung und die Azidose. Beitr. zur. chem. Physiol. u. Path. Bd. **10**. S. 80 (1907).

[3]) *Baer*, a. a. O.

[4]) *Allard*, Die Azidose beim Pankreasdiabetes. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **59**. S. 388 (1908).

[5]) *Leo Schwarz*, Über die Oxydation des Acetons und homologer Ketone der Fettsäurereihe. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **40**. S. 172 (1898).

1. Die Tatsache, daß alle Zustände, die mit Acetonausscheidung einhergehen, das Gemeinsame haben, daß Kohlenhydrate in geringerer Menge zur Verbrennung kommen als beim Gesunden (für den Diabetes allerdings nicht allgemein anerkannt): vor allem die Beobachtung, daß schon einfache Entziehung der Kohlenhydrate in der Nahrung zur Azidose führt.

2. Die Beobachtung, daß Zufuhr von Kohlenhydraten die Acetonkörperausscheidung[1]) regelmäßig herabsetzt (wenigstens beim Nichtdiabetiker). Auch nicht kohlenhydratartige Stoffe, die im Körper in Zucker übergehen, bewirken eine solche Herabsetzung (z. B. Glyzerin, Alanin). Man könnte daran denken, diese Wirkung mit zur Entscheidung der Frage heranzuziehen, ob eine Substanz ein Zuckerbildner ist. In der Tat liefert sie manchmal eine erwünschte Kontrolle bei der Beantwortung dieser Frage; eine entscheidende Bedeutung kann aber die Feststellung einer Acetonkörperverminderung schon deshalb nicht haben, weil es sich herausgestellt hat, daß sie auch durch Substanzen, die offenbar nicht in Zucker übergehen (Alkohol, Glutarsäure), verursacht werden kann.

Anknüpfend an die Tatsache, daß die Prozesse, die mit Acetonkörperausscheidung einhergehen, häufig Zeichen eines gesteigerten Eiweißzerfalles darbieten, hat man lange Zeit die Eiweißkörper als Muttersubstanz der Acetonsubstanzen angesehen. Doch ergaben sich bald Tatsachen, die mit dieser Auffassung nicht übereinstimmten.

1. Die Ausscheidung der Acetonkörper geht mit dem Eiweißzerfall (N-Ausscheidung) nicht parallel. Auch ohne N-Verlust, ja bei N-Ansatz, können Acetonkörper ausgeschieden werden.

2. Die quantitative Durchrechnung durch *Magnus-Levy*[2]) ergab, daß wenigstens in einzelnen Fällen die zersetzte Eiweißmenge nicht ausreicht, um die Gesamtmenge der ausgeschiedenen Acetonkörper zu erklären. Nach seiner Berechnung können 100 *g* Eiweiß höchstens 100 *g* Oxybuttersäure liefern (100 *g* Eiweiß enthalten 53 *g* C, davon sind ca. 7 *g*. als zur Bildung des $\overset{+}{U}$ nötig, abzuziehen[3]); bleiben 46 *g*; Oxybuttersäure enthält 46·2% C). In einem Falle von Coma diabeticum (VI) fand er innerhalb dreier Tage im Harn 43·3 *g* N, entsprechend 271 *g* zersetztem Eiweiß; die Menge der Acetonkörper, berechnet als Oxybuttersäure, betrug 342 *g*. Das zersetzte Eiweiß reichte somit zu ihrer Erklärung nicht aus.

3. Zufuhr von Fett und Fettsäuren steigert die Acetonkörperausscheidung.[4, 5]) Bei diesen Versuchen ergab sich zunächst, daß Buttersäure besonders leicht in Acetonkörper übergeht. Das war der erste Anhaltspunkt für die Annahme einer damals in vitro noch nicht ausführbaren Oxydation einer Fettsäure in β-Stellung.[5]) Die bei weiteren Versuchen ermittelte Tatsache, daß nur Fettsäuren mit einer g e r a d e n Anzahl von C-Atomen, die in einer geraden Kette angeordnet sind, Acetonbildner sind, also z. B. die normale Buttersäure, normale Capronsäure, Isovaleriansäure, nicht aber die normale Valeriansäure, geben ferner eine wichtige Bestätigung der auf einem ganz anderen Wege (siehe oben S. 1194) gewonnenen Erkenntnis, daß die Fettsäuren im Körper durch paarweise

---

[1]) *Rosenfeld,* Grundgesetze der Acetonurie und ihre Behandlung. Zentralbl. für innere Medizin. Bd. **16**. S. 1233 (1895). — *Hirschfeld,* Beobachtungen über die Acetonurie und über das Coma diabeticum. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **28**. S. 176 (1895).

[2]) *Magnus-Levy,* Die Oxybuttersäure und ihre Beziehung zum Coma diabeticum. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **42**. S. 221 (1899).

[3]) Ebenso wie bei der Berechnung der Zuckerbildung aus Eiweiß (siehe oben S. 1203) kann auch hier die Frage aufgeworfen werden, ob dieser Abzug berechtigt ist; er ist übrigens für das wesentliche Ergebnis der Rechnung in dem nachstehend zitierten Falle nicht ausschlaggebend.

[4]) *Geelmuyden,* Über Aceton als Stoffwechselprodukt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **23**. S. 431 (1897); Über die Acetonurie bei Phlorhizinvergiftung. Ebenda. Bd. **26**. S. 381 (1898).

[5]) *Leo Schwarz,* Über Acetonausscheidung. Verhandlungen des 18. Kongresses für innere Medizin. 1900. S. 480; Untersuchungen über Diabetes. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **76**. S. 233 (1903).

Abspaltung von C-Atomen abgebaut werden. Damit ist ferner verständlich geworden, warum im Organismus nur die Fettsäuren mit einer geraden Zahl von C weit verbreitet sind.

War damit das Fett, und zwar der Fettsäureanteil desselben (da das Glyzerin acetonherabsetzend wirkt) als Quelle der Acetonkörper festgestellt, so war doch die Möglichkeit, daß auch Eiweiß als Muttersubstanz in Betracht kommt, nicht widerlegt. Berechnungen von *Magnus-Levy*[1]) haben freilich ergeben, daß die Menge des zersetzten Fettes unter gewissen Voraussetzungen zur Deckung der gefundenen Acetonkörper ausreichen würde. Einen neuen Anstoß erhielt die Frage, als Untersuchungen an der künstlich durchbluteten Leber ergaben, daß auch einzelne Aminosäuren Aceton bilden können; Untersuchungen am lebenden Organismus haben dann bestätigt, daß unter den Spaltprodukten des Eiweißes sich solche finden, die Acetonkörper bilden (Leucin, wahrscheinlich auch Phenylalanin und Tyrosin) und solche, welche die entgegengesetzte Wirkung haben, zum Teil wohl deshalb, weil sie Zuckerbildner sind (Alanin). Solche Untersuchungen mit Aminosäuren haben gezeigt, daß gerade die Aminosäuren mit einer ungeraden Anzahl in gerader Kette angeordneter C-Atome Acetonbildner sind, z. B. Leucin.[2]) Diese Beobachtung lieferte auch die Basis für die Vorstellung, daß die Aminosäuren über die Stufe der nächstfolgenden Fettsäuren abgebaut werden. Diese Beobachtungen erklären ferner, daß Eiweißzulagen zwar im allgemeinen die Acetonausscheidung einschränken, daß diese Wirkung aber bei verschiedenen Eiweißkörpern verschieden stark ausgesprochen ist.[3])

Die Prüfung des Einflusses verschiedener anderer, besonders körperfremder Substanzen auf ihre Fähigkeit, in Acetonkörper überzugehen, hat ferner Aufklärung über das Schicksal von Substanzen mit verzweigter C-Kette im Organismus gebracht.[4])

Die zweite Hauptfrage war die, ob die Acetonkörper Substanzen sind, die auch im normalen Stoffwechsel als Zwischenprodukte auftreten. Diese Frage war für jeden der drei Körper besonders zu beantworten, wobei in erster Linie die Erfahrungen über die Verbrennlichkeit dieser Substanzen im gesunden und im kranken Organismus zu berücksichtigen waren.

Da das Aceton im normalen Organismus schwer verbrennlich ist, in den Exkreten des Gesunden sich aber nur in Spuren findet, so kann es nicht als normales intermediäres Produkt betrachtet werden.[5]) (S. oben S. 1191.) Bei der leichten Zersetzlichkeit der Acetessigsäure zu Aceton und CO_2 kann es kaum zweifelhaft erscheinen, daß das Aceton einer im kranken Körper eintretenden sekundären Zersetzung der Acetessigsäure seinen Ursprung verdankt.

Die beiden anderen Substanzen, Acetessigsäure und Oxybuttersäure, sind im normalen Organismus verbrennbar; im Organismus des Patienten mit Acetonkörperausscheidung ist ihre Verbrennlichkeit bedeutend herabgesetzt. Das führte zu folgender Überlegung: Da die im pathologischen Organismus nachgewiesene Störung der Verbrennlichkeit dieser Substanzen als zureichender Grund erscheint, warum sie ausge-

---

[1]) *Magnus-Levy*, Untersuchungen über die Acidosis im Diabetes melitus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **45**. S. 434 (1901).

[2]) *Baer* und *Blum*, Über den Abbau von Fettsäuren beim Diabetes melitus. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **55**. S. 89 (1906); Bd. **56**. S. 92 (1907); Bd. **59**. S. 321 (1908); Bd. **62**. S. 129 (1910).

[3]) *Borchardt*, Eiweißstoffwechsel und Acetonkörperausscheidung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **53**. S. 388 (1905).

[4]) *Baer* und *Blum*, Über den Abbau von Fettsäuren beim Diabetes melitus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **55**. S. 89 (1906); Bd. **56**. S. 92 (1906); Bd. **59**. S. 321 (1908); Bd. **62**. S. 129 (1910). — *E. Friedmann*, Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. III. Mitteilung. Beitr. z. chem. Phys. u. Path. Bd. **11**. S. 177 (1908).

[5]) *Geelmuyden*, Über Aceton als Stoffwechselprodukt. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **23**. S. 431 (1897). — *Leo Schwarz*, Über die Oxydation des Acetons und homologer Ketone der Fettreihe. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **40**. S. 168 (1898).

schieden werden, so ist die Annahme, daß schon ihre Bildung ein krankhafter, „perverser" Prozeß ist, überflüssig geworden und würde dem Prinzip, daß eine Erklärung möglichst einfach sein soll, nicht entsprechen. Die einfachste Erklärung bleibt also, hier eine Hemmung normaler Stoffwechselvorgänge, ein Stehenbleiben auf einer intermediären Stufe anzunehmen. Natürlich ist eine solche Überlegung nicht zwingend. Die gegebene Erklärung wird verlassen werden müssen, wenn sich Tatsachen ergeben, die mit ihr nicht in Einklang zu bringen sind.

Im vorliegenden Falle ist es ein Punkt, der durch die Annahme einer einfachen Hemmung zunächst nicht erklärt werden kann: Die Tatsache, daß gleich zwei Substanzen, die als Zwischenprodukte des normalen Stoffwechsels gedeutet werden können, im Harn erscheinen. Es müssen also Hemmungen auf zwei verschiedenen Stufen des Abbaues angenommen werden. Die Annahme zweier, voneinander unabhängiger Hemmungen ist aber zu kompliziert, um wahrscheinlich zu sein. Die Idee, daß diese beiden Hemmungen zueinander in einer gewissen Beziehung stehen könnten, führte zur Prüfung der Frage, ob hier vielleicht Gleichgewichtszustände eine Rolle spielen.[1] Man konnte sich vorstellen, daß der normale Abbau etwa den Weg Buttersäure-Oxybuttersäure-Acetessigsäure $- CO_2 + H_2O$ einschlägt und daß nun eine Hemmung des normalen Acetessigsäureabbaues dazu führt, daß sekundär auch die Bildung der Acetessigsäure aus der Oxybuttersäure gehemmt sei. Für diese Auffassung der Beziehung Oxybuttersäure-Acetessigsäure als einer Gleichgewichtsreaktion lassen sich folgende Gründe beibringen:

1. daß tatsächlich ein Gleichgewichtszustand zwischen beiden Substanzen beobachtet werden kann, insofern als die Menge der Acetessigsäure und der Oxybuttersäure im Harn in einem annähernd konstanten Verhältnis zueinander stehen[1];

2 die Beobachtung, daß nicht nur Zufuhr von Oxybuttersäure eine Vermehrung der Acetessigsäureausscheidung bedingt, sondern auch umgekehrt Acetessigsäuredarreichung eine Oxybuttersäurevermehrung[1, 2];

3. auch an isolierten Organen hat sich nicht nur die Oxydation der Oxybuttersäure zu Acetessigsäure, sondern auch der umgekehrte Prozeß feststellen lassen.[3]

Die Lösung der dritten Hauptfrage: Auf welchem Wege die Acetonkörper im gesunden Organismus weiter zu CO_2 und H_2O verbrannt werden, ist noch nicht gefunden. Sicher scheint nur, daß zum Ablauf dieses Prozesses eine gleichzeitige Verbrennung von Kohlenhydraten nötig ist. Man kann sich vorstellen, daß der Zucker oder eines der Abbauprodukte des Zuckers eine Verbindung, etwa eine Kondensation mit den Acetonkörpern eingehen müssen, um sie für den Körper angreifbar zu machen.[4] Wenn diese Idee richtig ist, so könnte ihre Verfolgung weitere Aufklärung nicht nur über den Abbau der Acetonkörper, sondern auch der Kohlenhydrate bringen. Jedenfalls wird jede Hypothese über die Verbrennung der Acetonkörper auf die Mitwirkung der Kohlenhydrate Rücksicht nehmen müssen, und umgekehrt wird eine Theorie über den Abbau des Zuckers nur dann befriedigend sein, wenn sie gleichzeitig die rätselhafte Rolle des Zuckers bei der Acetonkörperverbrennung zu erklären vermag. *Geelmuyden*[4]) denkt an die Glykuronsäure als an das nächste Abbauprodukt des Zuckers, und ver-

[1]) *O. Neubauer,* Ein Beitrag zur Kenntnis der diabetischen Azidose. Verhandlungen des 27. Kongresses f. inn. Med. 1910. S. 566.

[2]) *L. Blum,* Über den Abbau von Fettsäuren im Organismus und über die gegenseitigen Beziehungen der Acetonkörper. Münchener med. Wochenschr. Jg. **57**. S. 682 u. 1796 (1910); Über den Abbau von Fettsäuren im Organismus. Verhandlungen des 27. Kongr. f. inn. Med. 1910. S. 575. — *Dakin,* Die Bildung von Beta-Oxybuttersäure im tierischen Organismus. Münchener med. Wochenschr. Jg. **57**. S. 1450 (1910).

[3]) *Friedmann* und *Maase,* Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. XII. Mitteil. Biochem. Zeitschr. Bd. **27**. S. 474 (1910).

[4]) *Geelmuyden,* Über den Acetongehalt der Organe an Coma diabeticum Verstorbener nebst Beiträgen zur Theorie des Acetonstoffwechsels. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **41**. S. 128 (1904).

weist auf ihre acetonherabsetzende Wirkung. Unveröffentlichte Versuche des Referenten mit Brenztraubensäure, die auch als Abbauprodukt des Zuckers in Betracht kommt, haben keine acetonherabsetzende Wirkung erkennen lassen.

Minkowski u. A. haben den Gedanken geäußert, die Acetonkörper könnten als intermediäre Produkte bei der Bildung von Zucker aus Fett aufzufassen sein; zur Prüfung dieser Frage hat man untersucht, ob Darreichung von Acetessigsäure die Zuckerausscheidung diabetischer Tiere steigert; nach Versuchen von *Porges* und *Salomon*[1]) an pankreasdiabetischen Hunden, von *Geelmuyden*[2]) an phlorhizindiabetischen Kaninchen scheint das in der Tat zuzutreffen; doch sind die bisher vorliegenden Resultate noch nicht zwingend.

Baer und *Blum*[3]) haben eine Methode aufgezeigt, die es gestattet, die durch Phlorhizin erzeugten Stoffwechselstörungen in indirekter Weise zur Aufklärung des Schicksales von Dikarbonsäuren im Körper heranzuziehen. Sie haben die Beobachtung gemacht, daß die Dikarbonsäuren mit 5 und 6 C-Atomen, Glutarsäure und Adipinsäure, als Na-Salze subkutan injiziert, bei Hunden mit schwerem Phlorhizindiabetes ein starkes Herabgehen oder Verschwinden der Glykosurie und der Azidose und gleichzeitig starkes Sinken der N-Ausscheidung bewirken. In weiteren Untersuchungen haben sie festgestellt, daß diese Wirkung auch den vollständig hydroxylierten Dikarbonsäuren mit 5 und 6 C-Atomen zukommt (Zuckersäure, Trioxyglutarsäuren), ja auch der vollständig hydroxylierten Dikarbonsäure mit 4 C, der Weinsäure, trotzdem die entsprechende nicht hydroxylierte Dikarbonsäure, die Bernsteinsäure, wirkungslos ist. Sie glauben annehmen zu dürfen, daß Glutarsäure und Adipinsäure deshalb wirksam sind, weil sie im Körper in die vollständig hydroxylierten Säuren übergehen, während Bernsteinsäure unwirksam ist, weil sie nicht zu Weinsäure oxydiert wird.

Baer und *Blum* setzten sich nun das Ziel, den Weg zu finden, der von den unoxydierten Bikarbonsäuren zu den höchst hydroxylierten Dikarbonsäuren führt. Sie untersuchten deshalb verschiedene teilweise hydroxylierte Dikarbonsäuren; die Zwischenprodukte mußten ebenfalls wirksam sein. Bei den Säuren mit 5 C-Atomen ergaben sich folgende Resultate:

Glutarsäure . . .	$COOH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$	wirksam
α-Oxyglutarsäure . .	$COOH - CHOH - CH_2 - CH_2 - COOH$	unwirksam
β-Oxyglutarsäure . .	$COOH - CH_2 - CHOH - CH_2 - COOH$	wirksam
α-γ-Dioxyglutarsäure	$COOH - CHOH - CH_2 - CHOH - COOH$	„
Trioxyglutarsäure .	$COOH - CHOH - CHOH - CHOH - COOH$	„

Danach erfolgt also die Oxydation der Glutarsäure zu Trioxyglutarsäure jedenfalls nicht über die (unwirksame) α-Oxyglutarsäure, sondern entweder über die β-Oxyglutarsäure oder (weniger wahrscheinlich) über die α-γ-Dioxyglutarsäure.

---

[1]) *Porges,* Über den Abbau der Fettsäuren im Organismus. Ergebnisse d. Physiol. Jg. **10**. S. 46 (1910).

[2]) *Geelmuyden,* Über das Verhalten der Acetonkörper im intermediären Stoffwechsel. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **73**. S. 176 (1911).

[3]) *Baer* und *Blum,* Über die Einwirkung chemischer Substanzen auf die Zuckerausscheidung und die Azidose. I. Mitteilung. Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **10**. S. 80 (1907). — II. Mitteilung. Ebenda. Bd. **11**. S. 102 (1908). — III. Mitteilung. Archiv f. d. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. **65**. S. 1 (1911).

Als Beispiel sei ein Versuch mit β-Oxyglutarsäure angeführt:

Hund. 7800 *g*. 3 Tage Hunger, dann am Vortag und an den drei Versuchstagen 1·2 *g* Phlorhizin subkutan. Am 3. Versuchstag subkutan 7·4 *g* Oxyglutarsäure mit $NaHCO_3$ neutralisiert.

Versuchstag	Zucker *g*	N *g*	Aceton *g*	β Oxybuttersäure *g*
I.	17·0	7·23	0·440	1·95
II.	14·0	7·34	0·570	4·06
III.	< 1·0	1·34	0·044	0·14

D. Alkaptonurie.

Diese seltene Stoffwechselanomalie, die sich in der Ausscheidung von Homogentisinsäure (H) durch den Harn äußert, bietet Gelegenheit zu Studien über den Abbau des Eiweißes, insbesondere seiner aromatischen Bausteine. Die H entstammt dem Phenylalanin und Tyrosin des zersetzten Eiweißes, und die Annahme, daß sie auch beim Gesunden als intermediäres Produkt auftritt, ist zwar nicht erwiesen, aber doch recht wahrscheinlich.[1])

Die Größe der $\overline{H}$-Ausscheidung scheint bei gleicher Ernährung in allen Fällen fast gleich zu sein; wahrscheinlich deshalb, weil die Stoffwechselstörung in der Regel eine maximale ist. Trotzdem ist anzuraten, in jedem neuen Falle erst den Grad der Störung festzustellen. Man kann so vorgehen, daß man zunächst die $\overline{H}$-Menge bestimmt, die dem „endogenen Stoffwechsel" entstammt. Man gibt zu diesem Zwecke am besten zunächst eine fast N-freie Kost von ausreichendem Kalorienwert, z. B.: Schwarzer Kaffee oder Tee 400 cm^3, Reissuppe 300 cm^3, Kartoffeln (in irgendwelcher Zubereitung unter Verwendung von Butter) 300 *g*, Weißbrot 150 *g*, Gemüse (Spinat) 150 *g*, geräucherter Speck 60 *g*, süßes Obst (Kompott) 250 *g*, Zucker 60 *g*, Butter (zur Zubereitung der Speisen, auf Brot) 100 *g*, Wein 350 *g*. Diese Kost liefert ca. 3000 Kalorien und enthält nur ca. 3·8 *g* N.

Im Harn werden N und H, eventuell auch andere Bestandteile bestimmt. (Methoden siehe dieses Werk, Bd. II, S. 834.) Die Werte für N und H werden ähnlich wie N und D bei den Glykosurien, zueinander in Beziehung gesetzt, indem man den Quotient H : N berechnet, wobei N gewöhnlich gleich 100 gesetzt wird.[2]) Man erhält für $\overline{H}$ meist Werte zwischen 40 und 60.

Sobald die Zahl konstant geworden ist, geht man zu einer anderen Kost über, indem man z. B. täglich 300 *g* Fleisch (gleich 100 *g* Eiweiß) zulegt, bis wieder Konstanz erzielt ist. Da auch das Nahrungseiweiß $\overline{H}$ liefert, so steigt nicht nur N, sondern auch $\overline{H}$ an (exogene H). Der

[1]) Eine kurze Übersicht über den gegenwärtigen Stand der Frage nach der Stellung der H im intermediären Stoffwechsel siehe in *Abderhaldens* Biochemischem Handlexikon. Bd. IV. 2. S. 373.

[2]) *Langstein* und *Erich Meyer*, Beiträge zur Kenntnis der Alkaptonurie. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. 78. S. 161 (1903).

Quotient H : N ändert sich nicht wesentlich, außer wenn Eiweißkörper gegeben werden, die besonders reich oder besonders arm an aromatischen Aminosäuren sind (Kasein, Leim). Auch der Berechnung des Quotienten H : N dürfen keine zu kurzen Perioden zugrunde gelegt werden, jedenfalls nicht solche unter 24 Stunden; bei brüsker Koständerung noch längere.

Die Anordnung von Versuchen zur Aufklärung der Muttersubstanzen der H geschieht analog wie bei der gleichen Fragestellung beim Zucker und bei den Acetonkörpern. Als Standardkost empfiehlt sich eine ziemlich eiweißarme Diät. Empfehlenswert ist z. B. eine Zusammensetzung, die längere Zeit auch bei einem der am meisten untersuchten Fälle von Alkaptonurie (Körpergewicht 77 *kg*) Anwendung gefunden hat und die sich deshalb auch zum Vergleich anderer Fälle mit diesem Patienten eignen dürfte[1]: $^1/_2$ *l* Kaffee mit Milch, 90 *g* Weißbrot, 500 *g* Zucker, 100 *g* Rindfleisch, 160 *g* Kartoffelgemüse, 120 *g* grüner Salat, 110 *g* Pfannkuchen, 160 *g* Kompott, 100 *g* Wurst, 70 *g* Preißelbeeren, 300 *g* Rotwein, $^1/_2$ *l* Bier. Stickstoffgehalt 12·37 *g*. Kalorienwert ca. 2300 Kalorien.[2]

---

[1]) *O. Neubauer*, Über den Abbau der Aminosäuren im gesunden und kranken Organismus. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. **95**. S. 223. (1909).

[2]) Es dürfte überhaupt zweckmäßig sein,. wenn man sich allgemein auf mehrere bestimmte, überall leicht zusammenstellbare Kostformen einigen würde, um einen quantitativen Vergleich verschiedener Fälle von Stoffwechselstörungen zu ermöglichen. Als eine solche Diät würde sich z. B. diejenige eignen, die *O. Folin* (Analyse of thirty „normal" urines. Americ. Journ. of Physiol. Vol. **13**. p. 45 [1905]) der Analyse der Urine von 5 gesunden Personen zugrunde gelegt hat: Vollmilch 500 cm^3, Rahm (Fettgehalt 18—22%) 300 cm^3, Eier 450 *g*, *Horlicks* Malzmilch (ein amerikanisches, leicht lösliches Nährpräparat; Generalvertretung von *Horlicks* Malzmilch Co. für Deutschland in Halle a. S.) 200 *g*, ferner Zucker 200 *g*, Kochsalz 6 *g* und Wasser, um das Ganze auf 2 *l* zu bringen; außerdem noch Wasser zum Trinken 900 cm^3.

In flüssiger Mischung enthielt diese Kost: N 18·95 *g*, entsprechend Eiweiß 119 *g*, Fett zirka 148 *g*, Kohlenhydrate 225 *g*, Cl 6·14 *g*, SO_3 3·75 *g*, P_2O_5 5·78 *g*.

Die Untersuchung der Urine ergab folgende Werte:

	Durchschnitt	Maximum	Minimum
Harnmenge in cm^3	1430	1812	1196
Acidität in cm^3 $\frac{N}{10}$ Säure	617	669	554
Gesamt-N in *g*	16·0	18·2	14·8
$\overset{+}{\text{U}}$-N	13·9	16·2	12·8
NH_3-N	0·70	0·85	0·55
Kreatinin-N	0·58	0·66	0·50
$\overline{\text{U}}$-N	0·12	0·15	0·08
Rest-N	0·60	0·85	0·41
Gesamt-S als SO_3 berechnet, in *g*	3·31	3·73	3·11
Sulfatschwefelsäure SO_3 berechnet in *g*	2·92	3·25	2·67
Ätherschwefelsäure „ „ „	0·22	0·25	0·19
„neutraler Schwefel" „ „ „ „	0·17	0·19	0·13
Phosphorsäure, als P_2O_5 berechnet, in *g*	3·87	4·50	3·44
Chlor in *g*	6·1	6·9	5·6

Das Körpergewicht der Versuchspersonen (Durchschnitt 63·1 Maximum 70·5 Minimum 56·5 *kg*) zeigte bei dieser Ernährung nur unwesentliche Änderungen.

In der Hauptperiode wird die zu prüfende Substanz zugelegt. Im allgemeinen hat die Einverleibung einer in H übergehenden Substanz eine beträchtliche Vermehrung von H und gleichzeitige Steigerung des Quotienten H : N zur Folge. Die Beachtung dieses Quotienten schützt vor einer Täuschung infolge einer durch die gegebene Substanz bewirkten Steigerung des Eiweißzerfalls. Die Ergebnisse solcher Versuche und die Schlußfolgerungen über den Abbau des Tyrosins, des Phenylalanins und der übrigen Aminosäuren, die sich an sie geknüpft haben, können hier übergangen werden. Der Gedankengang war vielfach ein ähnlicher wie bei den Untersuchungen über die Acetonkörper.[1])

Auch zur Aufklärung verschiedener anderer Punkte des Eiweißstoffwechsels kann die Alkaptonurie herangezogen werden. Beim Gesunden verfügen wir zur Kontrolle des Eiweißstoffwechsels eigentlich nur über die Bestimmung des Harn-N (daneben höchstens noch über die des Harn-S). Der N des Harns entstammt aber nicht nur dem Eiweiß, sondern auch anderen Quellen, und verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, daß die N-Ausscheidung durchaus nicht immer ein quantitativer Ausdruck für den Eiweißzerfall ist[2]) (Retention von N-haltigen „Schlacken"). Beim Alkaptonuriker bietet nun die Verfolgung der H-Ausscheidung eine erwünschte, einfach auszuführende Kontrolle.

Es hat sich ergeben, daß beim Übergang von eiweißreicher zu eiweißarmer Nahrung und umgekehrt die H-Ausscheidung viel rascher der Veränderung des Eiweißgehaltes der Kost folgt als die N-Ausscheidung.[3]) Daraus ergeben sich Folgerungen über die Natur des „zirkulierenden Eiweißes". Wenn es sich bei diesem überhaupt um echtes Eiweiß handelt, so muß es zum mindesten ärmer an aromatischen Gruppen sein als das gewöhnliche Eiweiß. In gleichem Sinne spricht, daß der durch vermehrte Flüssigkeitszufuhr ausschwemmbare N nicht von einer gleichzeitigen H-Vermehrung begleitet ist.[4]) Auch zur Entscheidung der Frage, ob bei einer bestimmten Kost im wesentlichen das zugeführte Nahrungseiweiß oder das Körpereiweiß zerfällt, wurde ein bei der Alkaptonurie durchführbarer Versuchsplan entworfen.

Die Alkaptonurie ist zu Untersuchungen über den Stoffwechsel deswegen besonders geeignet, weil die Versuchsindividuen im wesentlichen als gesund zu betrachten sind, weil die Störung eine relativ einfache, gleichmäßige, wahrscheinlich maximale ist, und weil eine Reihe von anderen Methoden zur Verfügung stehen, um die gewonnenen Ergebnisse zu kontrollieren (Untersuchungen am Gesunden, Übergang von H und ihren Muttersubstanzen in Acetonkörper).

---

[1]) S. Biochemisches Handlexikon. Bd. IV. 2. S. 373.

[2]) *Abderhalden*, Lehrbuch der physiologischen Chemie. Berlin und Wien 1906. S. 682 ff.

[3]) *Langstein* und *Erich Meyer*, a. a. O.

[4]) *Abderhalden* und *Bloch*, Untersuchungen über den Eiweißstoffwechsel, ausgeführt an einem Alkaptonuriker. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **53**. S. 464 (1907).

E. Cystinurie.

Die Cystinurie ist eine chronische Stoffwechselanomalie, bei der Cystin in erheblicher Menge mit dem Harn ausgeschieden wird. Neben dem Cystin können sich dabei im Harn auch andere Aminosäuren (Tyrosin, Leuzin, eine tryptophanähnliche Substanz), noch öfter aber Diamine (Putreszin, Kadaverin) finden. Die letzteren sind zweifellos aus Diaminosäuren entstanden; für das Histidin ist eine analoge Störung noch nicht festgestellt.[1])

Die Cystinurie hat sich bisher nicht in so ausgedehntem Maße zum Studium des intermediären Eiweißstoffwechsels heranziehen lassen wie etwa die Alkaptonurie. Die Störung ist in einzelnen Fällen verschieden hochgradig (tägliche Cystinmenge von Spuren bis 1·5 *g*). Auch zeigen die einzelnen Fälle in ihrem Verlaufe häufig Intensitätsschwankungen, können sogar vollständig ausheilen. Die Größe der Cystinausscheidung scheint von der Art der Nahrung meist unabhängig zu sein[2]), so daß es sich im wesentlichen um eine Störung des „endogenen" Eiweißstoffwechsels handeln dürfte. Auch sonst haben sich gerade die Störungen des endogenen Stoffwechsels den Bestrebungen, sie zur Erforschung des intermediären Stoffwechsels zu verwerten, bisher als schwer zugänglich erwiesen (z. B. die Pentosurie). Selbst verabreichtes Cystin ist manchmal auf die Menge des ausgeschiedenen Cystins ohne Einfluß.[3])

Loewy und *Neuberg*[4]) haben die interessante Entdeckung gemacht, daß in manchen Fällen von Cystinurie zugeführte Aminosäuren (Leuzin, Tyrosin, Asparaginsäure und auch Cystin selbst) nicht wie beim Gesunden verbrannt werden, sondern annähernd quantitativ im Harn wieder erscheinen. In analoger Weise können Diaminosäuren (Lysin, Arginin) als Diamine (Kadavarin, Putreszin) ausgeschieden werden. In dem Falle von *Loewy* und *Neuberg* konnte auch nach Eingabe von 10·5 *g* durch langdauernde Pankreasverdauung vollständig aufgespaltenem Fibrin eine Ausscheidung von Tyrosin, Tryptophan und Glykokoll und vermutlich auch Histidin nachgewiesen werden. Zufuhr von Eiweiß oder von Polypeptiden führte dagegen nicht zur Ausscheidung von Aminosäuren. Diese Erfahrung steht in einem gewissen Gegensatz zu der modernen Anschauung von der vollständigen Aufspaltung der Eiweißkörper der Nahrung im Verdauungskanal. Da zudem das Verhalten in verschiedenen Fällen von Cystinurie nicht das gleiche ist, so wird man weitere Untersuchungen abwarten

---

[1]) *Groß*, Über Cystinurie. Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München. Bd. **24**. S. 97 (1908).

[2]) *Mester*, Beiträge zur Kenntnis der Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 109 (1889). — *H. Leo*, Über Cystinurie. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **16**. S. 325 (1889).

[3]) *Alsberg* und *Folin*, Proteinmetabolism in Cystinuria. Americ. Journ. of the med. Sciences. 1906. Februar. — *Thiele*, Concerning cystinuria and diamines. Journ. of Physiol. Vol. **36**. p. 68 (1907—1908).

[4]) *Löwy* und *Neuberg*, Über Cystinurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **43**. S. 338 (1904); Biochem. Zeitschr. Bd. **2**. S. 438 (1907).

müssen, ehe man diesen Tatsachen einen entscheidenden Wert für die Beurteilung des normalen intermediären Stoffwechsels beimißt.

In jedem Falle von Cystinurie, der zu Stoffwechselversuchen herangezogen werden soll, wird man also bei einer konstanten Kost die Cystinmengen im Harne und ihre Abhängigkeit respektive Unabhängigkeit von der Ernährung zu kontrollieren haben. Weiter wird festzustellen sein, ob Amine oder Diamine zugegen sind oder ob sie nach Einführung von Aminosäuren respektive Diaminosäuren auftreten. Über die Methoden des Nachweises siehe dieses Werk, Bd. III, S. 810.

Wegen der nahen Beziehung des Cystins zum Taurin der Galle ist eventuell auch zu untersuchen, ob durch Beeinflussung der Taurocholsäuresynthese, z. B. durch Cholsäurezufuhr, eine Änderung der Cystinausscheidung zu erzielen ist.[1])

F. Störungen der Stoffwechselfunktion der Leber.

Krankheiten des Menschen, bei welchen die Annahme einer schweren Störung der Stoffwechselfunktion der Leber gerechtfertigt ist, sind selten. Es kommen hauptsächlich in Betracht: die akute gelbe Leberatrophie, die Phosphorvergiftung und wohl auch die Eklampsie. Bei diesen Krankheiten findet man im Harn eine Reihe von pathologischen Produkten, deren genaueres Studium Aufschlüsse über den intermediären Stoffwechsel verspricht: Albumosen, Aminosäuren (Leuzin, Tyrosin, Alanin, Glykokoll); ferner eine aromatische Säure, die früher als p-Oxymandelsäure aufgefaßt, neuerdings als l-p-Oxyphenylmilchsäure erkannt wurde, und die nach ihrer Formel zweifellos als Abbauprodukt des Tyrosins anzusehen ist[2]); ferner Milchsäure und eine vermehrte Menge von flüchtigen Fettsäuren. Weiter hat man bei diesen schweren Lebererkrankungen eine bedeutende Steigerung des NH_3-Gehaltes im Harn gefunden und zunächst daran gedacht, daß darin ein Ausdruck der Störung der harnstoffbildenden Funktion der Leber zu erblicken sei. Nach den Untersuchungen *Münzers*[3]) dürfte sie jedoch im wesentlichen aus der gleichzeitigen Säuerung zu erklären sein.

Es ist noch unbekannt, wie weit die beobachteten Stoffwechselstörungen bei diesen schweren Leberkrankheiten als Folge eines einfachen Ausfalls der physiologischen Leberfunktion aufzufassen sind, und wie weit pathologische Prozesse in der erkrankten Leber (autolytische Vorgänge) für sie verantwortlich gemacht werden müssen.

Eine eingehende experimentelle Prüfung der durch diese Befunde angeregten Fragen ist am kranken Menschen kaum möglich wegen der Seltenheit, des unregelmäßigen Verlaufes und der kurzen Dauer dieser Krankheiten,

---

[1]) *Simon* und *Campbell*, Über Fütterungsversuche mit Cholalsäure bei Cystinurie. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. **5**. S. 401 (1904).

[2]) S. Biochem. Handlexikon. Bd. IV. S. 380 (1911).

[3]) *Münzer*, Die harnstoffbildende Funktion der Leber. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 33. S. 164 (1894); Die Bedeutung der Ammoniaksalze für die Pathologie. Prager med. Wochenschr. Jg. **22**. S. 171 (1897).

sowie wegen der Rücksichtnahme, die der schwere Zustand der Patienten erfordert. Zum eingehenden Studium ist das Tierexperiment heranzuziehen.

Bei denjenigen Lebererkrankungen, bei welchen das Leberparenchym vollständig oder zu einem großen Teil erhalten bleibt (Leberzirrhose, Karzinom, Icterus catarrhalis etc.), treten Störungen des Stoffwechsels infolge Insuffizienz der Leber nicht in den Vordergrund. In einigen Fällen wurde allerdings Milchsäure im Harn gefunden, auch eine Vermehrung des NH_3 als Folge der Säuerung festgestellt (*Münzer*). Bei der Leberzirrhose beherrschen vielmehr die Störungen infolge Einengung des Pfortaderkreislaufs das Krankheitsbild. Es liegen viele Angaben vor, daß zugeführte Lävulose, Galaktose, Aminosäuren bei verschiedenen Leberkrankheiten schlechter verwertet werden. Es ist noch nicht entschieden, ob das als Ausdruck einer eigentlichen Herabsetzung der Leberfunktion aufgefaßt werden muß oder ob nicht vielmehr die Erklärung zutrifft, daß in diesen Fällen ein Teil des resorbierten Materiales die Leber gar nicht passiert, sondern durch die Anastomosen direkt ins Hohlvenenblut kommt.

Die experimentelle Phosphorvergiftung des Tieres erzeugt im Prinzip dieselben Störungen wie die Phosphorvergiftung des Menschen. Sie ist schon häufig zum Studium von Stoffwechselfragen herangezogen worden. Über die Technik der Phosphorvergiftung siehe unten S. 1233.

Abderhalden und *Bergell*[1]) haben Kaninchen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen je 1—5 *mg* P als Ol. phosphoratum subkutan injiziert und nachher mit Hilfe der Naphthalinsulfochloridmethode Aminosäuren, speziell Glykokoll, aus dem Harn gewonnen.

Kotake[2]) vergiftete zwei Hunde von 7—8 *kg* Körpergewicht mit je 10 *g* P in Pillenform; am nächsten Tage bekamen sie die doppelte Dosis. Am folgenden Tage gingen sie zugrunde. Aus dem Harn ließ sich l-Oxyphenylmilchsäure gewinnen.

Takeda[3]) gelang es, P-vergiftete Hunde relativ lange Zeit am Leben zu erhalten und aus ihrem Harn Basen zu isolieren; vor allem das Butyrobetain, das offenbar aus Glutaminsäure entstanden ist. Er erreichte dieses Resultat, indem er seinen Tieren etwa jeden 3. bis 4. Tag P. in Olivenöl gelöst, subkutan injizierte. Nur zwischen der 1. und 2. Injektion ließ er eine längere Pause, 5—6 Tage. Die Einzeldose war für Hunde von 12—15 *kg* 1 *cg*, für einen Hund von 24 *kg* 2—3 *cg*. Lebensdauer bis zu 42 Tagen.

Jastrowitz[4]) vergiftete einen 13·2 *kg* schweren Hund, indem er ihm jeden 4. Tag 50 *mg* P per os einführte und fand, daß dieser Hund eingeführtes Glykokoll viel schlechter verbrannte als ein normales Tier.

---

[1]) *Abderhalden* und *Bergell*, Über das Auftreten von Monoaminosäuren im Harn von Kaninchen nach Phosphorvergiftung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. S. 464 (1903).

[2]) *Kotake*, Über l-Oxyphenylmilchsäure und ihr Vorkommen im Harn bei Phosphorvergiftung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **65**. S. 397 (1910).

[3]) *Takeda*, Untersuchungen über einige nach Phosphorvergiftungen im Harn auftretende Basen. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **133**. S. 365 (1910).

[4]) *Jastrowitz*, Versuche über Glykokollabbau bei Leberschädigungen. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **59**. S. 463 (1908).

Ernst Neubauer[1]) hat untersucht, ob sich nicht an P-vergifteten Kaninchen die Quelle der im Harn ausgeschiedenen Milchsäure feststellen läßt. Die Tiere bekamen eine einmalige Dose von 10—15 *mg* P subkutan. Es zeigte sich, daß zugeführte Milchsäure den Milchsäuregehalt des Harns nicht beträchtlich steigerte, daß somit das Phosphortier die Fähigkeit, Milchsäure zu verbrennen, nicht verloren hat. Dementsprechend vermochten Fütterungsversuche mit anderen Substanzen (Zucker, Alanin) keinen sicheren Aufschluß über die Muttersubstanz der Harnmilchsäure zu geben. Danach wäre diese also als pathologisches Produkt nur des endogenen Stoffwechsels anzusehen.

Mandel und *Lusk*[2]) kombinierten bei Hunden P-Vergiftung mit Phlorhizin-Diabetes, indem sie entweder 3mal täglich Phlorhizin gaben und vom 3. Tage ab Phosphoröl in 1%iger öliger Lösung (1—3 cm^3), oder indem sie umgekehrt ein phosphorvergiftetes Tier nachträglich mit Phlorhizin behandelten. Sie fanden, daß die Phlorhizinvergiftung die Milchsäureausscheidung verhindert; das spricht wohl in dem Sinne, daß die Milchsäure im Harn P-vergifteter Tiere aus Zucker hervorgeht oder wenigstens aus einem Komplex, der bei der Phlorhizinvergiftung Zucker liefert.

Die schwerste Schädigung der Leberfunktion wird natürlich durch die vollständige Exstirpation des Organs gesetzt.

Relativ einfach ist diese Operation bei Kaltblütlern auszuführen. *Johannes Müller*[3]) unterband bei Fröschen durch eine gemeinsame Ligatur alle zur Leber führenden und von ihr abgehenden Blutgefäße sowie den Gallengang, schnitt dann die Leber heraus und vernähte die Bauchwunde. Die Tiere blieben 4 Tage lang am Leben. *Moleschotts*[4]) Frösche lebten sogar bis zu 20 Tagen. *Nebelthau*[5]) exstirpierte 265 Fröschen die Lebern, sammelte während 4 Tagen ihren Harn und erhielt aus diesem 0·1279 *g* eines Zinksalzes, das wahrscheinlich milchsaures Zink war.

Schröder[6]) hat an der zoologischen Station in Neapel Leberexstirpationen beim Katzenhai (Scyllium catulus) ausgeführt. Das Tier wird in Rückenlage auf einem Tisch fixiert. Dann wird in der linea alba entsprechend dem vordersten Teile der Bauchhöhle ein 3—4 *cm* langer Schnitt gemacht. Man zieht die Eingeweide heraus, legt um alle Gefäße starke Ligaturen und exstirpiert die Leber. Nach sorgfältigem Verschluß der

---

[1]) *Ernst Neubauer,* Über das Schicksal der Milchsäure bei normalen und phosphorvergifteten Tieren. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **61**. S. 387 (1909).

[2]) *Mandel* and *Lusk,* Lactic acid in intermediary metabolism. American. Journ. of Physiol. Vol. **16**. p. 129 (1906).

[3]) *Johannes Müller,* Handbuch der Physiologie des Menschen. 4. Aufl. Koblenz 1844. Bd. **1**. S. 131.

[4]) *Moleschott,* Untersuchungen über die Bildungsstätte der Galle. Arch. f. physiol. Heilkunde. B. **11**. S. 479 (1852).

[5]) *E. Nebelthau,* Tritt beim Kaltblütler nach Ausschaltung der Leber im Harn Fleischmilchsäure auf? Zeitschr. f. Biol. Bd. **25**. S. 123 (1889).

[6]) *Schröder,* Über die Harnstoffbildung der Haifische. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **14**. S. 576 (1890).

Wunde wird das Tier in ein Bassin gesetzt und ist nach kurzer Zeit in nichts von einem normalen Exemplar zu unterscheiden. Es lebt noch etwa 4 Tage.

Beim Vogel gelingt eine vollständige Ausschaltung der Leber durch Unterbindung aller Blutgefäße und des Gallengangs, wie sie z. B. von *Stern* an der Taube ausgeführt worden ist.[1] Doch hörte dann die Harnsekretion auf.

Viel günstigere Resultate liefert das Verfahren, das *Minkowski* in seinen berühmten Experimenten eingeschlagen hat [2]: die Exstirpation der Leber bei Gänsen. Bezüglich der Technik siehe die Originalpublikation. Das Pfortaderblut gelangt durch die Vena Jacobsonii in die Hohlvene; die Tiere überleben die Operation viele Stunden lang und sezernieren noch reichlich dünnflüssigen Harn. Die von *Minkowski* und anderen Autoren [3] mit Hilfe dieser Methodik gefundenen Tatsachen (Abnahme der Harnsäure, Auftreten von NH_3 und Fleischmilchsäure, Zunahme der Fleischmilchsäure nach Eingabe von Glykokoll und Asparaginsäure etc.) sind für die Kenntnis des intermediären Stoffwechsels des Vogels grundlegend geworden.

Beim Säugetier stößt der Versuch, die Leber auszuschalten, auf außerordentlich große Schwierigkeiten, weil zwischen Pfortadergebiet und unterer Hohlvene keine Gefäßanastomose besteht. Nach einfacher Abbindung der Pfortader respektive des ganzen Hilus hepatis gehen Hunde in längstens 100 Minuten zugrunde; wie man annimmt, infolge einer Art „Verblutung" in das Pfortadergebiet.

Pavy und *Siau* [4]) gehen deshalb in der Weise vor, daß sie gleichzeitig mit der Leber alle Organe des Pfortadergebietes entfernen.

Das Abdomen des Tieres (Hunde, Katzen) wird geöffnet, das Rektum zwischen zwei Ligaturen abgeschnitten. A. mesenterica sup., inf. und coeliaca werden unterbunden und durchtrennt und ebenso alle Verbindungen mit der Leberpforte; sodann wird die Kardia abgebunden und durchtrennt, Magen, Darm, Pankreas und Milz entfernt. Darauf wird ein Leberlappen nach dem anderen hervorgezogen, an seiner Basis abgebunden und möglichst nahe an der Ligatur abgeschnitten. Man muß darauf achten, daß die Vena cava nicht mitgefaßt wird. Die Reste der Leber, die in der Nähe der Vena

---

[1]) *Stern*, Beiträge zur Pathologie der Leber und des Ikterus. 1. Mitt. Arch. f. d. exp. Path. u. Pharm. Bd. **19**. S. 39 (1885). S. auch *Scaffidi*, Über Veränderungen des Gasstoffwechsels nach Ausschaltung des Leberkreislaufs. Biochem. Zeitschr. Bd. **14**. S. 156 (1908). (Versuche an Enten.)

[2]) *Minkowski*, Über den Einfluß der Leberexstirpation auf den Stoffwechsel. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **21**. S. 41 (1886).

[3]) *Kausch*, Der Zuckerverbrauch im Diabetes melitus des Vogels nach Pankreasexstirpation. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **39**. S. 219 (1897). — S. *Lang*, Über die Schwefelausscheidung nach Leberexstirpation. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **29**. S. 305 (1900). — Über die Stickstoffausscheidung nach Leberexstirpation. Ebenda Bd. **32**. S. 320 (1901).

[4]) *Pavy* and *Siau*, The influences of ablation of the liver on the sugar contents of the blood. Journ. of Physiol. Vol. **29**. p. 375 (1903).

cava zurückbleiben, sind bei sauberem Arbeiten außerordentlich gering. Die Hunde bleiben etwa 4 Stunden am Leben. Länger dauernde Versuche sind hier also nicht durchführbar (wohl aber z. B. Blutzuckerbestimmungen). Ferner darf man nicht vergessen, daß diesen Tieren nicht nur die Leber, sondern auch andere wichtige Organe fehlen.

Slosse[1]) hat bei kleinen Hunden die Organe des Pfortadergebietes durch Unterbindung der 3 Darmarterien (A. coeliaca, A. mesenterica sup. und inf.) ausgeschaltet. Das Tier liegt mit der rechten Seite auf einer gepolsterten Unterlage; auf seiner linken Seite wird ein Längsschnitt geführt, der unter der letzten Rippe beginnt und sich bis nahe zum Darmbein erstreckt. Die Wunde durchsetzt die Cutis, die Scheide des Sacrolumbalis an ihrem von der Wirbelsäule abgewendeten Rande und gelangt damit hinter das parietale Blatt des Peritoneums auf die vor den Lendenwirbeln gelegenen Weichteile. Sorgfältige Blutstillung ist nötig, um die Arterien auffinden, umschlingen und unterbinden zu können. Die Technik muß vorher an der Leiche eingeübt werden. Nach dem Schließen der Bauchwunde erholt sich das Tier zunächst, nach etwa 2 Stunden treten aber schwere Krankheitserscheinungen ein und nach meist 5—6 Stunden geht das Tier zugrunde.

O. Porges[2]) hat bei großen Kaninchen mit der Leber gleichzeitig das ganze Gebiet der Aorta abdominalis ausgeschaltet. Nach 24- bis 48stündigem Hungern erhielten die Tiere große Dosen von Urethan per os; ½ Stunde später wurden sie aufgebunden; dann wurde die Trachea herauspräpariert, die Bauchhöhle durch einen Kreuzschnitt geöffnet, die Aorta und die V. cava inferior samt den Lebervenen unmittelbar am Durchtritt durch das Zwerchfell unterbunden, schließlich die Pfortader ligiert, die Bauchhöhle geschlossen. Dann wurde die Trachea geöffnet und eine Trachealkanüle eingeführt.

In der Exspirationsluft wurde der respiratorische Quotient bestimmt; er war gegenüber den Kontrolltieren erhöht (ca 0·9); daraus wurde geschlossen, daß in den so verstümmelten Tieren fast nur Kohlenhydrate zur Verbrennung kommen.

O. Porges und *Salomon*[2]) wendeten dann eine ähnliche Versuchstechnik auch bei hungernden pankreasdiabetischen Hunden an.

Eine weitgehende Ausschaltung der Leberfunktion, welche die Tiere längere Zeit überleben, gelingt dadurch, daß man durch Anlegen einer künstlichen Kommunikation zwischen Vena portae und Vena cava ähnliche Verhältnisse schafft, wie sie bei den Vögeln gegeben sind (*Eck*-

[1]) *Slosse,* Der Harn nach Unterbindung der drei Darmarterien. Arch. f. (Anat. u.) Physiol 1890. S. 482.

[2]) *O. Porges,* Über den respiratorischen Quotienten nach Ausschaltung der Abdominalorgane. Biochem. Zeitschr. Bd. 27. S. 131 (1910). — *O. Porges* und *H. Salomon,* Über den respiratorischen Quotienten pankreasdiabetischer Hunde nach Ausschaltung der Abdominalorgane. Biochem. Zeitschr. Bd. 27. S. 143 (1910).

sche Fistel). Technik siehe Bd. III, S. 114.[1]) Die Ausschaltung der Leber aus dem Stoffwechsel ist dabei allerdings keine vollständige, da ja die A. hepatica noch Blut einströmen läßt; aber gerade deshalb bleiben die Tiere längere Zeit am Leben und können zu Stoffwechselversuchen verwendet werden. Namentlich die russischen Autoren haben an solchen Tieren die harnstoffbildende Funktion der Leber untersucht.[2]) Aus der Beobachtung, daß solche Hunde nach reichlicher Fleischfütterung in ihrem Harn Carbaminsäure ausscheiden und Vergiftungssymptome darbieten, welche denen nach Einführung von Carbamaten in die Blutbahn ähnlich sind, haben diese Autoren die Ansicht gewonnen, daß die Carbaminsäure die Vorstufe des Harnstoffes ist, deren Umwandlung in Harnstoff der Leber obliege.

Die Ausschaltung der Leber durch die *Eck*sche Operation liefert eine allgemein anwendbare Methode, um zu beurteilen, ob ein Stoffwechselvorgang ausschließlich an die Leber gebunden ist. So haben *Abderhalden* und *London*[3]) die Rolle der Leber bei der Synthese der Eiweißkörper aus den Aminosäuren untersucht. Es gelang ihnen, bei einem nach *Eck* operierten Hunde mit vollständig abgebautem Eiweiß N-Retention zu erzielen. Die Funktion der Leber ist also bei der Eiweißsynthese jedenfalls nicht unersetzbar.

Will man die Leber völlig ausschalten, so muß man die *Eck*sche Operation mit Unterbindung der Leberarterie kombinieren. Dann tritt der Tod aber innerhalb weniger Stunden ein, so daß die Tiere zu Stoffwechselversuchen kaum benutzt werden können.

Einen einfachen Weg, um die Funktion der Leber auszuschalten, ohne sie zu exstirpieren, bietet die Methode der Säureverödung nach *E. Pick*[4]): Man legt den Ductus choledochus unter antiseptischen Kautelen frei, bindet eine Glaskanüle ein und läßt aus einer langen, mit einem Quetschhahn versehenen Bürette unter einem Druck, der einer 40—100 *cm* hohen Wassersäule entspricht, $\frac{n}{25}$-Schwefelsäure einlaufen, etwa 6—7 cm^3 pro Kilogramm Tier. *Fr. Pick* zieht $\frac{n}{40}$-Schwefelsäure vor, 15—20 cm^3 pro Kilogramm.[5]) Dann wird der Duct. choledochus abgebunden und die Bauchhöhle geschlossen.

---

[1]) Eine Modifikation der Methode wurde neuerdings von *Fischler* und *Schröder* angegeben: Eine einfachere Ausführung der *Eck*schen Fistel. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 61. S. 428 (1909).

[2]) *M. Hahn, O. Massen, M. Nencki* und *J. Pawlow*, Die *Eck*sche Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen für den Organismus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 32. S. 161 (1892).

[3]) *Abderhalden* und *London*, Weitere Versuche zur Frage nach der Verwertung von tief abgebautem Eiweiß im tierischen Organismus, ausgeführt an einem Hunde mit einer *Eck*schen Fistel. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 54. S. 80 (1907).

[4]) *E. Pick*, Versuche über funktionelle Ausschaltung der Leber bei Säugetieren. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 32. S. 382 (1893).

[5]) *Friedel Pick*, Über die Beziehungen der Leber zum Kohlenhydratstoffwechsel. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 33. S. 305 (1894).

Hunde, die in dieser Weise behandelt sind, befinden sich durch etwa 15—27 Stunden relativ wohl und gehen dann unter charakteristischen Erscheinungen zugrunde. Der Grad der Leberverödung ist jedesmal durch die Sektion zu kontrollieren. Auch an Katzen kann der Eingriff ausgeführt werden. Kaninchen pflegen die Operation nur ganz kurze Zeit zu überleben.

Ein Nachteil der Methode ist es, daß infolge der Notwendigkeit, alle Gallengänge zu unterbinden, Gallenretention und schwerer Ikterus eintritt. Ferner ist die Leberzerstörung keine vollständige; die resorbierte Säure kann ihrerseits Vergiftungserscheinungen hervorrufen. Die Methode ist zum Studium des Kohlenhydratstoffwechsels und zur Untersuchung der harnstoffbildenden Funktion der Leber herangezogen worden.[1,2])

G. Schädigungen des Verdauungstraktes.

Die Untersuchungen bei krankhaften Störungen des Verdauungsapparates kommen, soweit lediglich die resorptiven Funktionen gestört sind, für das Studium des intermediären Stoffwechsels nicht in Betracht. Die Darmschleimhaut ist aber höchstwahrscheinlich auch der Sitz der ersten Veränderungen des resorbierten Materiales, die also bereits dem intermediären Stoffwechsel zuzurechnen sind. Manche Beobachtungen sprechen dafür, daß auch diese Funktionen bei Krankheiten beeinträchtigt sein können (Albumosurie bei Darmkrankheiten, stark ausgesprochene Acetonurie bei manchen Darmaffektionen, Übertritt verschiedener Kohlenhydrate in den Harn bei magendarmkranken Säuglingen usw.). Für das Studium des intermediären Stoffwechsels sind diese Zustände aber noch nicht methodisch herangezogen worden.

Bei Tieren dürfte eine vollständige Ausschaltung des Darmes auf operativem Wege gelingen.

H. Fettige Degeneration.

Das Studium der fettigen Degeneration hat bei der Diskussion der Frage, ob Eiweiß im Organismus in Fett übergehen kann, eine große Rolle gespielt. Neben gelegentlichen Untersuchungen an menschlichen, fettig degenerierten Organen ist hier besonders das Tierexperiment herangezogen worden. Fettige Degeneration kann bei Tieren durch verschiedene Gifte erzeugt werden: P, As, Sb, Phlorhizin, Ol. Pulegii, Terpentinöl, Safrol, Apiol, Rosmarinöl, Chloroform, Alkohol, Benzol, Thymol, Nitrobenzol, Jodoform, Bakterientoxine (z. B. Diphtherietoxin); ferner durch Pankreasexstirpation und durch Inanition.

[1]) *Friedel Pick*, Über die Beziehungen der Leber zum Kohlenhydratstoffwechsel. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **33**. S. 305 (1894).

[2]) *V. Lieblein*, Die Stickstoffausscheidung nach Leberverödung beim Säugetier. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **33**. S. 318 (1894).

Die Vergiftung mit Phosphor hat weitaus am häufigsten Anwendung gefunden. Die Hauptschwierigkeit liegt in der Art der Applikation und in der Dosierung des Giftes.

Zur Darreichung per os wird der P in Pillenform gebracht oder er wird als Emulsion gegeben; jedoch bekommen die Tiere (Hunde) danach leicht Erbrechen, besonders wenn sie gefüttert worden sind.

H. Leo[1]) hat die Darreichung per anum empfohlen: ein kleines Reagensgläschen, in dem sich ein Stück P befindet, wird zur Hälfte mit kochendem Wasser gefüllt, hierauf mit einem Korkstöpsel verschlossen und bis zur Abkühlung des Wassers energisch geschüttelt. Dadurch wird der durch das heiße Wasser verflüssigte Phosphor auf das feinste verteilt und setzt sich nach dem Abkühlen als Pulver ab. Dieses wird dann mittels eines Katheters in das Rectum des Tieres eingeführt.

Die subkutane Darreichung hat mit der Schwerlöslichkeit des P in Wasser zu rechnen. Die meisten Autoren haben zur Injektion 1%ige oder 2%ige Lösungen in Mandelöl oder in Olivenöl oder auch Emulsionen mit Gummilösung verwendet. Zu beachten ist, daß bei Untersuchungen über den Fettgehalt der Organe Injektionen von öligen Lösungen Versuchsfehler verursachen können. Da die Lösungen und Emulsionen von P regelmäßig stark sauer reagieren, so soll durch Sodazusatz neutrale oder schwach alkalische Reaktion hergestellt werden. Die Resorption öliger Lösungen aus dem Unterhautfettgewebe ist von allen möglichen unberechenbaren Zufälligkeiten abhängig, so daß die Intensität der Wirkung nicht genau vorauszubestimmen ist.

Auch intravenöse Applikation wurde in Anwendung gezogen[2]), führt aber leicht zu Ölembolien in den Lungen. *H. Meyer*[3]) zog daher die Einspritzung in eine Arterie vor: das P-Öl wird mit kohlensaurem Natron möglichst fein emulgiert und in peripherer Richtung in die Arteria femoralis injiziert, so daß es durch die Kapillaren der Extremität gleichsam hindurchfiltriert.

Das Abwägen des Phosphors (gelber Phosphor) muß unter Wasser erfolgen. Der Gehalt der Lösungen und Emulsionen an P bleibt nicht konstant. Auch der P-Gehalt des Ol. phosphorat. der Apotheken ist nicht verläßlich. *H. Meyer* hat den Gehalt der Emulsionen regelmäßig durch Oxydation mit Salpetersäure und Fällen mit Mg-Mixtur bestimmt.

Die zu wählende Dose ist natürlich verschieden nach Art und Größe des Tieres, nach der Applikationsweise und nach dem Grade der Vergiftung, die erzeugt werden soll.

---

[1]) *H. Leo*, Fettbildung und Fetttransport bei Phosphorintoxikation. Zeitschr. für physiol. Chem. Bd. 9. S. 469 (1885).

[2]) *L. Hermann* und *Brunner*, Ein Versuch zur Lehre von der akuten Phosphorvergiftung. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 3. S. 1 (1870).

[3]) *H. Meyer*, Über die Wirkung des Phosphors auf den tierischen Organismus. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 14. S. 313 (1881).

Bei Hunden wurden sowohl bei stomachaler wie bei subkutaner Applikation in der Regel 10—40 *mg* verwendet (bei Tieren von etwa 10 *kg* Körpergewicht). Der Tod tritt dann meist etwa in 4—6 Tagen ein. *Wakemann*[1]) ist es bei wiederholten (6—13) Injektionen kleinerer Dosen von P-Öl (meist jeden dritten Tag 0·5—0·8 cm^3 1⁰/₀₀igen Phosphoröls) gelungen, die Tiere ziemlich lange am Leben zu erhalten (s. auch *Takedas* Versuche oben S. 1227).

Bei Mäusen erzeugten *Kraus* und *Sommer*[2]) P-Vergiftungen durch tägliche Darreichung von 3 *mg* P in Pillenform. Tod nach 5—7 Tagen.

Bei Kaninchen kommen ähnliche Dosen zur Anwendung: 5 bis 10 bis 40 *mg* in öliger Lösung subkutan. Tod gewöhnlich am 5. bis 7. Tage.

Bei Hühnern wurde neben der subkutanen Injektion (10 *mg*) auch die orale Applikation gewählt. *Fraenkel* und *Roehmann*[3]) verfuhren in der Weise, daß sie täglich ein Stückchen Phosphor (8—10—20 *mg*) unter Wasser abschnitten, in dem mit Wasser gefüllten Pyknometer wogen und dann dem Tiere mit einer Brotpille in den Hals schoben. Die Tiere gingen nach 4—8 Tagen zugrunde.

Bei Fröschen kann man den Phosphor entweder unter die Haut oder in den Rückenlymphsack einspritzen, oder man injiziert die warme P-Emulsion mittelst einer *Pravaz*schen Spritze und eines Gummischlauches in den Magen.[4]) Erbrechen tritt nicht ein. *Leo* hat auch bei Fröschen die Applikation per anum bevorzugt. Nach einer Dosis von 1—4 *mg* bleiben die Tiere noch 1—8 Tage am Leben. Bei vergleichenden Untersuchungen über Fettdegeneration bei Fröschen hat man vor allem auf die sehr verschiedene Ausbildung der Fettkörper Rücksicht zu nehmen. Man soll aus diesem Grunde nur gleich große Tiere gleichen Geschlechtes, am besten Männchen, zu diesen Versuchen heranziehen. *Polimanti*[5]) empfiehlt vor Anstellung des Versuches die Fettkörper zu exstirpieren: man öffnet die Bauchhöhle, bindet mit einer Fadenschlinge das Organ erst auf der einen, dann auf der anderen Seite ab, schneidet ab und schließt die Wunde.

P-vergiftete Tiere verweigern im allgemeinen die Nahrungsaufnahme; schon aus diesem Grunde ist es meist zweckmäßig, die Versuche von vornherein im vollständigen Hungerzustande auszuführen, eventuell schon eine längerdauernde Karenzperiode vorausgehen zu lassen. Übrigens wird bei der P-Vergiftung die fettige Degeneration durch Darreichung von Kohlenhydraten nicht hintangehalten. Bei extrem fettarm gemachten Tieren

---

[1]) *Wakemann*, Über die chemische Veränderung der Leber bei der Phosphorvergiftung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **44**. S. 335 (1905).

[2]) *Kraus* und *Sommer*, Über Fettbildung bei Phosphorintoxikation. Beiträge zur chem. Physiol. u. Path. Bd. **2**. S. 86 (1902).

[3]) *Fraenkel* und *Roehmann*, Phosphorvergiftung bei Hühnern. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **4**. S. 439 (1880).

[4]) *Athanasiu*, Die Erzeugung von Fett im tierischen Körper unter dem Einfluß von Phosphor. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **74**. S. 511 (1899).

[5]) *Polimanti*, Über die Bildung von Fett im Organismus nach Phosphorvergiftung. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **70**. S. 349 (1898).

erzeugt Phosphor (wie auch andere ähnliche Gifte) keine Verfettung mehr: ein Beweis, daß es sich bei der Verfettung nicht um eine Bildung von Fett aus Eiweiß handelt.[1] Das Ansteigen des Fettgehaltes des Blutes bei der Phosphorvergiftung spricht ebenfalls dafür, daß das Fett durch Transport aus den Depots in die inneren Organe gelangt.

Zu berücksichtigen ist, daß die Störung bei der Phosphorvergiftung sich nicht allein auf die fettige Degeneration beschränkt, sondern daß auch schwere Störungen des Kohlenhydrat- und des Eiweißstoffwechsels vorhanden sind. Ähnliches gilt wohl auch von den meisten anderen Giften, mit denen man fettige Degeneration hervorrufen kann.

Daß man mit Phlorhizin eine hochgradige Verfettung der Leber erzeugen kann, hat *Rosenfeld*[2]) beschrieben. Er gab Hunden von 3—5 *kg* Körpergewicht, die 5 Tage gehungert hatten, am 6. und 7. Tage 10 *g* Phlorhizin pro Kilogramm Körpergewicht in Wasser und tötete die Tiere am 8. Tage. Er fand dann regelmäßig eine Fettleber mit einem Fettgehalt von 25—75%, auf Trockensubstanz berechnet. Werden die Tiere am Leben gelassen, so heilt die Fettleber wieder. Darreichung von Glykogenbildnern beschleunigt diese Heilung, wie sie auch von vornherein die Entstehung der Fettleber zu verhindern vermag. Nach *Rosenfeld*[3]) ist damit sogar eine Methode gegeben, um festzustellen, ob eine Substanz ein Glykogenbildner ist.

Um mit Alkohol Leberverfettung mit Sicherheit zu erzeugen, hat *Rosenfeld* folgende Methode angegeben: Man läßt Hunde 5 Tage lang hungern und gibt ihnen dann täglich $3^1/_2$—4 cm^3 Alkohol pro Kilogramm ohne sonstige Nahrung. Ertragen sie mehr als 4 solche Dosen, so haben sie eine Fettleber von durchschnittlich 22%. Auch diese Verfettung heilt aus.

Auch die von *Falk*[4]) beschriebene Verfettung der inneren Organe durch Ol. pulegii ist zu Versuchen herangezogen worden. Das Mittel wirkt analog wie Phosphor.

Andere Gifte, durch die ebenfalls Verfettung erzielt werden kann, wurden oben genannt, sind aber zu Stoffwechselversuchen kaum herangezogen worden.

Auch durch reichliche Blutentziehungen gelingt es, Verfettung zu erzeugen.

Litten[5]) hat hungernde Meerschweinchen mehrere Tage lang einer Überhitzung (36—37°) ausgesetzt und so fettige Degeneration erzielt.

---

[1]) *G. Rosenfeld*, Fettbildung II. Ergebnisse d. Physiol. Jg. II. Biochem. S. 50 (1903).

[2]) *G. Rosenfeld*, Die Fettleber beim Phlorhizindiabetes. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **28**. S. 256 (1895).

[3]) *G. Rosenfeld*, Beiträge zur Pathologie des Alkohols. Zentralbl. f. innere Med. Bd. **21**. S. 1049 (1900).

[4]) *Falk*, Über Oleum pulegii. Therapeutische Monatshefte. Bd. **4**. S. 448 (1890).

[5]) *Litten*, Über die Einwirkung erhöhter Temperatur auf den Organismus. *Virchows* Archiv. Bd. **70**. S. 10 (1877).

Nach *Mottram*[1]) bewirkt bei Meerschweinchen und bei Kaninchen schon kurzdauernder Hunger (24—48 Stunden) eine beträchtliche Fettzunahme in der Leber.

Um die Wanderungen des Fettes im Organismus, besonders bei der pathologischen Verfettung, verfolgen zu können, hat *Lebedeff*[2]) zuerst versucht, den Versuchstieren mit der Nahrung ein Fett beizubringen, das sich von dem Körperfett unterscheidet und deshalb in den Organen leicht erkannt und bestimmt werden kann.

Er fütterte einen 11·6 *kg* schweren Hund $1^1/_2$ Wochen lang mit Fleisch und Leinöl (2680 *g* Fleisch, 2015 *g* Leinöl). Dann ließ er ihn, um den Darmkanal von Nahrungsfett zu befreien, 24 Stunden hungern, gab 80 *mg* P in Lösung und nach 2 Tagen nochmals dieselbe Dosis; 35 Stunden später ging das Tier zugrunde. Das Fett aus dem Unterhautzellgewebe, den Muskeln und den inneren Organen wurde durch Extraktion mit Alkohol und Äther gewonnen, durch Lösen in einer kleinen Menge Äther gereinigt und in folgender Weise untersucht:

Eine gewogene Menge wird durch alkoholische Natronlauge verseift; die Natronseifen werden in die Bleiseifen übergeführt; aus diesen wird durch Äther das ölsaure und leinölsaure Blei extrahiert; aus der ätherischen Lösung werden die freien Ölsäuren durch HCl abgeschieden, der Äther durch Destillation entfernt und das Wasser vorsichtig von den Ölsäuren getrennt; durch das Gemisch beider Ölsäuren wird salpetrige Säure durchgeleitet; dabei wird die Ölsäure in feste Elaidinsäure umgewandelt, während die Leinölsäure flüssig bleibt (auch die Unlöslichkeit des leinölsauren Ba in Äther kann zur Trennung der Leinölsäure von der Ölsäure verwendet werden). Auf diese Weise wurde im Leberfett 54% Leinölsäure gefunden; damit war bewiesen, daß das Fett der fettig degenerierten Organe wenigstens zu einem großen Teil aus dem Nahrungsfett stammt, also nicht aus dem Körpereiweiß entstanden ist.

Lebedeffs Methode zum Nachweis der Fettwanderung ist dann besonders von *Rosenfeld* weiter ausgebildet und zu zahlreichen Experimenten herangezogen worden. Um die Versuche recht beweisend zu gestalten, sollen die Fettdepots des Tieres vom Körperfett möglichst befreit und dann durch das körperfremde Fett angefüllt werden. Darauf wird die Leber durch längeres Hungern wieder möglichst fettfrei gemacht und erst dann die Vergiftung eingeleitet. Als Kontrolltiere dienen Hunde, die ebenso vorbehandelt, aber nicht vergiftet worden sind. Als körperfremde Fette können die oben S. 1157 erwähnten Fette Verwendung finden. Beispiele für solche Versuche bei *Rosenfeld*, Fettbildung II. Ergebnisse der Physiologie II, Biochemie S. 64 ff. (1903).

[1]) *Mottram*, Fettinfiltration der Leber, durch Hunger verursacht. Zeitschr. f. Biol Bd. **52**. S. 280 (1909).

[2]) *Lebedeff*, Woraus bildet sich das Fett in Fällen der akuten Fettbildung? Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **31**. S. 11 (1883).

Leick und *Winckler* [1]) haben mit derselben Methode auch für die Herzverfettung bei P-Vergiftung die Entstehung auf dem Wege der Fetteinwanderung aus den Depots sichergestellt. Zur Untersuchung des verfetteten Herzmuskels sind nur die mittleren Schichten des Herzmuskels heranzuziehen.[2])

Über die Fettbestimmung in den fettig degenerierten Organen und über die Methoden der Charakterisierung des Organfettes siehe dieses Werk, Bd. II, S. 199 und Bd. V, S. 477. Zu beachten ist, daß nach *Rosenfeld* speziell in der Niere des Menschen die makroskopische und mikroskopische Schätzung des Fettgehaltes vollständig versagt; der „Verfettung" im morphologischen Sinn entspricht nicht immer eine wirkliche Vermehrung des Fettgehaltes.

J. Störungen der Respiration.

Die menschliche Pathologie bietet häufig Gelegenheit, den Stoffwechsel bei Sauerstoffmangel zu untersuchen. Eine Erschwerung der Versorgung der Gewebe mit O kann durch verschiedene Momente verursacht sein: Durch Atmung in verdünnter Luft, durch Störung der äußeren Respiration (Lähmungen und Krämpfe der Atmungsmuskel, Stenose der Atmungswege, Erkrankungen der Lunge, des Herzens); durch Erkrankung des O-Trägers im Blut (CO-Vergiftung, schwere Anämien) und endlich durch Störung der Respiration der Gewebe (Blausäurevergiftung). Bei all diesen Prozessen hat man öfters Stoffe im Urin gefunden, welche als intermediäre Stoffe, als Produkte einer unvollständigen Oxydation gedeutet worden sind.

So besonders die Milchsäure bei schweren Herzfehlern (*Voges*, *Zuelzer*), bei hochgradiger Anämie (*Hoppe-Seyler*), in der Agone (*Irisawa*), bei der CO-Vergiftung (*Münzer* und *Palma*); vielleicht gehört auch die Milchsäureausscheidung nach dem epileptischen Anfall (*Araki*, *Rohde*) hierher. Über den Nachweis der Milchsäure im Urin und im Blut siehe dieses Werk, Bd. II, S. 28 und Bd. V, S. 1254.

Ferner Traubenzucker: sehr häufig wurde dieser bei der CO-Vergiftung gefunden; bei schwerer Dyspnoe dagegen in der Regel nicht. *Naunyn* erwähnt zwei Fälle, in welchen nach lang bestehender Dyspnoe der Zuckergehalt des Blutes vermehrt war. *Paul Mayer* hat angegeben, daß bei dyspnoischen Zuständen verhältnismäßig oft Glykuronsäure als unvollständiges Oxydationsprodukt des Zuckers im Harn gefunden wird.

Frerichs und *Wöhler* betrachten die Oxalsäure als Produkt einer unvollständigen Oxydation der Harnsäure.

van Hoogenhuyze und *Verploegh* [3]) haben ihre Kreatinin- und Kreatinausscheidung in Utrecht, auf dem Col d'Olen (2000 *m*) und auf der

[1]) *Leick* und *Winckler*, Die Herkunft des Fettes bei Fettmetamorphose des Herzfleisches. Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. 48. S. 163 (1902).

[2]) *Krehl*, Über fettige Degeneration des Herzens. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. 51. S. 416 (1893).

[3]) *van Hoogenhuyze* und *Verploegh*, Über den Einfluß von Sauerstoffarmut auf die Kreatininausscheidung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 59. S. 101 (1909).

Margheritahütte (4560 *m*) bei gleicher Kost verglichen. In der Höhe war die Kreatininausscheidung gesteigert. Sie sehen dies als eine Folge des Sauerstoffmangels an, da auf dem Col d'Olen bei Einatmung von reinem Sauerstoff die Kreatininmenge wieder sank.

Eingehende Untersuchungen ermöglichen erst Tierexperimente.

Um Respirationsstörungen bei Tieren künstlich hervorzurufen, bediente sich *Senator*[1]) der Einschnürung des Thorax durch eine elastische Binde, die nach Bedürfnis mehr weniger fest angezogen werden konnte. Das Verfahren hat vor anderen (z. B. dem früher geübten der Einspritzung von Öl in die Luftröhre) den Vorteil, daß es jede Körperverletzung vermeidet. *Senator* beobachtete bei seinen Tieren wiederholt Glykosurie; auch fiel auf, daß der Harn stärker sauer wurde.

Simanowsky und *Schoumoff*[2]) behinderten die Atmung der Tiere durch Umschnürung der Trachea; sie fanden, daß solche Tiere eine Störung des Oxydationsvermögens darbieten, indem sie von eingegebenem Benzol einen viel kleineren Teil zu Phenol oxydieren als normale.

Reale und *Boeri*[3]) hinderten die Atmung von Hunden durch ein *Sayre*sches Gipskorsett; sie fanden eine Steigerung der Oxalsäureausscheidung.

F. Hoppe-Seyler und seine Schüler *Stroganow* und *Araki* erzeugten Dyspnoe durch ungenügende O-Zufuhr. Sie brachten die Versuchstiere in einen ziemlich luftdichten Holzkasten oder unter eine Glasglocke. Sie sorgten dafür, daß die ausgeatmete CO_2 durch Kalilauge absorbiert und immer wieder durch atmosphärische Luft ersetzt wurde; der O-Gehalt nahm infolgedessen langsam ab und die Dyspnoe entwickelte sich ganz allmählich. Bei einem Gehalt der Atmungsluft von ungefähr 3·5% O tritt der Tod ein. Abbildung des Apparates siehe bei *Stroganow* und bei *Hoppe-Seyler*.[4]) Man kann zu derartigen Versuchen auch N und O (oder atmosphärische Luft) aus Bomben in beliebiger Weise mischen und durch die Glasglocke durchleiten.

Araki[5]) fand mit der *Hoppe-Seyler*schen Versuchsanordnung bei Hunden und Hühnern fast immer Zucker und Milchsäure im Harn.

---

[1]) *Senator*, Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß der Respirationsstörungen auf den Stoffwechsel. *Virchows* Archiv. Bd. **42**. S. 1 (1868).

[2]) *Simanowsky* und *Schoumoff*, Über den Einfluß der Alkalien und des Morphiums auf die physiologische Oxydation. Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **34**. S. 251 (1884).

[3]) *Reale* und *Boeri*, Über die Bildung der Oxalsäure im Organismus bei Sauerstoffmangel. Wiener med. Wochenschr. 1893. S. 1545.

[4]) *Stroganow*, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsprozesse im normalen und Erstickungsblute. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. **12**. S. 18 (1862). — *Hoppe-Seyler*, Bemerkungen zu der Mitteilung von Herrn *D. Araki*. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **19**. S. 476 (1894).

[5]) *Araki*, Über die Bildung von Milchsäure und Glykose im Organismus bei Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **15**. S. 335 (1891). — Über die chemischen Änderungen der Lebensprozesse infolge von Sauerstoffmangel. Ebenda. Bd. **19**. S. 422 (1893).

P. Mayer[1]) erzeugte bei einem Kaninchen Dyspnoe, indem er in die Trachea ein Glasrohr mit Gummischlauch und Quetschhahn einband. Im Harn der nächsten 12 Stunden konnte er nicht nur Zucker, sondern auch erhebliche Mengen von gepaarter Glykuronsäure nachweisen. Er faßt die Glykuronsäure als Produkt einer unvollkommenen Zuckerverbrennung auf.

Störungen des O-Austausches der Gewebe durch experimentell gesetzte Anämie suchte *Araki*[2]) durch ausgiebige Aderlässe zu erreichen (bei Kaninchen 60—100 cm^3, bei mittelgroßen Hunden bis zu ca. 800 cm^3). Er konnte aber keine abnormen Substanzen im Harn finden.

Ferner gibt es eine Reihe von Giften, deren Wirkung als Folge gestörter O-Atmung aufgefaßt wird.

In erster Linie steht hier das Kohlenoxyd, das bekanntlich mit dem Hb des Blutes eine feste Verbindung eingeht, so daß dieses seiner Funktion als O-Überträger nicht mehr nachkommen kann. Im Harn der vergifteten Tiere hat man fast regelmäßig Zucker (*Richardson*[3]) und Milchsäure (*Araki*[2]) gefunden. *Zuntz* deutete die Befunde bei CO-Vergiftung als Folgen einer Beeinträchtigung der Oxydationsvorgänge; doch ist diese Auffassung nicht sicher bewiesen (es ist auch die Hippursäuresynthese gehemmt).

Zur experimentellen CO-Vergiftung hat man Hunde, Kaninchen und Hühner verwendet. Die Verwendung von Leuchtgas ist, da dieses auch noch andere giftige Stoffe enthält, zu verwerfen. Besser ist schon die Verwendung von Kohlendunst, z. B. das Aufstellen eines mit Steinkohlen gefüllten Windofens.[4]) Am richtigsten ist es, reines CO-Gas herzustellen, entweder durch Erhitzen von konzentrierter Ameisensäure oder von gelbem Blutlaugensalz mit konzentrierter Schwefelsäure. Das gebildete Gas wird mit konzentrierter Schwefelsäure und Kalilauge gewaschen und in einem Gasometer aufbewahrt.

Die Vergiftung erfolgt entweder in der Weise, daß man das Tier in einen abgeschlossenen, mit CO-haltiger Luft gefüllten Raum bringt (Glasglocke, Kasten), oder indem man das in einem Gasometer vorrätig gehaltene CO durch eine aus Tierblase bestehende Maske inhalieren läßt; die Einatmung erfolgt nicht direkt aus dem Gasometer, sondern aus einer je nach Bedarf gefüllten Tierblase, die mit der Maske durch ein T-Rohr ver-

---

[1]) *P. Mayer*, Über unvollkommene Zuckeroxydation im Organismus. Deutsche med. Wochenschr. Jg. 27. S. 243 u. 262 (1901).

[2]) *Araki*, Über die chemischen Änderungen der Lebensprozesse infolge von O-Mangel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **19**. S. 422 (1893).

[3]) *Richardson*, Lecture on diabetes delivered at the Grosvenorplace. Medic. Times and Gazette. Vol. **1**. p. 233 (1862).

[4]) *Riefel* und *Poleck*, Über Kohlendunst und Leuchtgasvergiftung. Zeitschr. f. Biol. Bd. **16**. S. 277 (1880).

bunden ist (*Straub*[1]). Die Dosierung ist ziemlich schwierig. Sie muß nach den eintretenden Vergiftungserscheinungen geregelt werden. Die Vergiftung darf nicht zu schwach sein, wenn es zu den charakteristischen Erscheinungen der Stoffwechselstörung kommen soll. Hunde läßt man so lange CO einatmen, bis Krämpfe eintreten: dann muß man aussetzen, weil sonst die Tiere zugrunde gehen. Wenn Herzstillstand droht, so muß künstliche Atmung eingeleitet werden. In der Regel erholen sich die Tiere sehr rasch wieder von der Vergiftung. Es empfiehlt sich, die Vergiftung im Laufe von 1—1½ Stunden 4—5mal zu wiederholen. Nach der 3. und 4. Vergiftung muß man eine etwas längere Pause eintreten lassen. Das Tier kann jeden Tag zu neuen Versuchen verwendet werden, da weder chronische Vergiftung, noch Angewöhnung eintritt.[1])

Will man mit Sicherheit Glykosurie erzeugen, so verwendet man reichlich, speziell mit Eiweiß, gefütterte Tiere.

Hungertiere (3—8tägiges Hungern) bekommen durch CO keine Glykosurie. Sie sind daher geeignet zur Entscheidung der Frage nach der Quelle des bei der Vergiftung ausgeschiedenen Zuckers. Man kontrolliert zunächst, daß das Tier bei CO-Vergiftung im Hungerzustande keinen Zucker ausscheidet und gibt dann erst die zu prüfende Substanz. So wurde gefunden, daß beim CO-Diabetes in Zucker übergehen: Fleisch, Eiereiweiß, Leim, Asparaginsäure, Glutaminsäure, die alkohollöslichen Produkte aus pankreasverdautem Fibrin; dagegen n i c h t: Traubenzucker (!), Milchzucker, Stärke (!), alkohollösliches „Pepton“, die basischen Substanzen der Eiweißverdauung, Leuzin.

M i l c h s ä u r e findet sich im Harn der CO-vergifteten Tiere dagegen auch im Hungerzustande.[2]) Es ist festgestellt, daß CO-vergiftete Tiere im Gegensatz zu normalen zugeführte Milchsäure nur sehr schlecht verbrennen, daß also wohl eine Hemmung der Abbauprozesse vorliegt. Die CO-Vergiftung dürfte sich deshalb zu Studien über die Quellen dieses wichtigen intermediären Stoffwechselprozesses eignen.

Auch bei vielen anderen Stoffwechselgiften hat man angenommen, daß sie durch Beeinträchtigung der O-Atmung wirken.[3])

So sollen die Blutgifte (Nitrite, Amylnitrit, Nitrobenzol, Anilin, Toluylendiamin, Pyrogallol, Gallensäuren, Arsenwasserstoff usw.) durch Zerstörung der roten Blutkörperchen dazu führen, daß die Gewebe nicht mehr genügend mit O versorgt werden.

---

[1]) *Straub*, Über die Bedingungen des Auftretens der Glykosurie nach der CO-Vergiftung. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **38**. S. 139 (1897). — *Rosenstein*, Über den Einfluß der Nahrung auf die Zuckerausscheidung beim CO-Diabetes. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. **40**. S. 363 (1898). — *Vamossy*, Beitrag zur Kenntnis des Kohlenoxyddiabetes. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. **41**. S. 273 (1898). — *S. Weber*, Über die Beeinflussung des Stoffwechsels durch einige pharmakologisch wichtige Stoffe. Ergebnisse der Physiologie. Jg. III. Biochemie. S. 233 (1904).

[2]) *Araki*, Über die Bildung von Milchsäure und Glykose im Organismus bei Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **15**. S. 335 (1891).

[3]) *S. O. Loewi*, Arzneimittel und Gifte in ihrem Einfluß auf den Stoffwechsel in *v. Noordens* Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels. Bd. **2**. S. 692 (1907).

Andere Gifte dürften die O-Atmung dadurch stören, daß sie die Atmung und Zirkulation beeinträchtigen: Narkotika in großen Dosen (Äther, Aceton, Chloroform, Morphium), Curare; die Krampfgifte (Strychnin) außerdem auch noch dadurch, daß sie gleichzeitig durch die Auslösung der Krämpfe eine Steigerung des O-Bedürfnisses verursachen.

Von der **Blausäure** wird angenommen, daß sie direkt die Oxydationsenergie der Zellen beeinträchtigt.[1])

Auch die Stoffwechselgifte, welche (wie der Phosphor) eine Verfettung der Organe bedingen (s. oben S. 1232), setzen die Oxydationsprozesse herab.

Es ist bemerkenswert, daß man bei all diesen verschiedenen Vergiftungen geradeso wie bei Dyspnoe so häufig Zucker und Milchsäure im Harn gefunden hat; danach ist es in der Tat wahrscheinlich, daß bei diesen Vergiftungen Störungen der Oxydationsprozesse vorliegen; doch sind die Verhältnisse sicher viel komplizierter als bei der einfachen Behinderung der äußeren Atmung. Das ist wohl der Grund, warum diese Vergiftungen zur Erforschung des intermediären Stoffwechsels so wenig herangezogen worden sind, mit Ausnahme der P-Vergiftung, bei der aber die besondere Schädigung der Leber einen sehr wesentlichen Anteil an dem Krankheitsbilde hat.

Die meisten Autoren haben das Auftreten der genannten pathologischen Produkte (Zucker, Milchsäure, Vermehrung der Oxalsäure, des Kreatinins, der Glykuronsäure) im Harn bei Behinderung der Atmung so aufgefaßt, daß diese Stoffe Zwischenprodukte des normalen intermediären Stoffwechsels seien, die aber infolge des gesetzten O-Mangels der weiteren Oxydation entgehen. Demgegenüber muß aber betont werden, daß möglicherweise unter dem Einfuß des O-Mangels die Stoffwechselprozesse von vornherein ganz anders verlaufen als unter den gewöhnlichen Lebensbedingungen.

K. Anoxybiose.

Die gleiche Frage ergibt sich, wenn man die Erfahrungen, die beim Leben unter vollständigem Ausschluß des O gewonnen worden sind, zur Aufklärung intermediärer Vorgänge verwerten will. Nur dann, wenn die Besonderheiten des anoxybiotischen Stoffwechsels so zu erklären sind, daß infolge Sauerstoffmangels die Abbauprozesse vorzeitig abgebrochen werden, darf man seine Endprodukte mit den Zwischenprodukten des oxybiotischen Stoffwechsels identifizieren.

Warmblüter sind zu Versuchen unter vollständig anoxybiotischen Bedingungen nicht geeignet, weil sie bei vollständigem Sauerstoffmangel sofort zugrunde gehen. Eine Ausnahme machen nur die „heterothermen" Tiere während des Winterschlafes, währenddessen sie sich wie Kaltblüter verhalten.[2]) In diesem Zustande bleiben sie im sauerstoffreien Raum eine

---

[1]) *Zillessen,* Über die Bildung von Milchsäure und Glykose in den Organen bei gestörter Zirkulation und bei der Blausäurevergiftung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 15. S. 387 (1891).

[2]) Siehe *Merzbacher,* Allgemeine Physiologie des Winterschlafs. Ergebnisse der Physiologie. Jg. 3. Biophysik. S. 214 (1904).

Zeitlang am Leben. So hat *Koeninck*[1]) Fledermäuse in einem abgesperrten Raum von 140 *cm*³ entsprechend etwa 28 *cm*³ Sauerstoff bis zu zwei Tagen am Leben erhalten. Ähnliche Erfahrungen haben *Reignault* und *Reiset* an winterschlafenden Murmeltieren gemacht.

Anoxybiotisch verlaufen ferner die Prozesse bei der Autolyse von Warmblüterorganen (siehe unten).

Darauf, daß Kaltblüter in O-freier Luft zu leben vermögen, hat *Pflüger*[2]) die allgemeine Aufmerksamkeit gelenkt. Er brachte Frösche, nachdem er ihre Lungen unter Hg gut ausgedrückt hatte, in reinen N unter eine mit schmelzendem Eis gekühlte, durch Hg abgeschlossene Glasglocke. Die Tiere blieben mindestens $11^1/_2$ Stunden am Leben, bei völliger Integrität ihrer wesentlichen Funktionen; dann traten Lähmungen auf, doch erholten sich die Tiere wieder, wenn sie an die Luft gebracht wurden.

E. Lesser[3]) hält die Frösche (Winterfrösche) in Rezipienten von $1^1/_2$ *l* Inhalt, die unter Wasser oder Hg versenkt sind; es wird reiner N hindurchgeleitet. Zur Verwendung kommt N aus Bomben; er muß von beigemengtem O gereinigt werden, indem er durch ein *Pettenkofer*sches Rohr mit Cu-Spiralen und NH_3 und $CO_3(NH_4)_2$ geleitet wird; zur völligen Entfernung des Sauerstoffes passiert er dann noch zwei Gaswaschflaschen, die mit alkalischer Pyrogallollösung (KOH 75% mit 10% Pyrogallussäure) gefüllt und in heiße Wasserbäder (70 und 90°) versenkt sind; weiter geht der Gasstrom durch eine mit 5%iger KOH gefüllte und durch kaltes Wasser gekühlte Gaswaschflasche. *Lesser* hat unter diesen Bedingungen den Gaswechsel und die Wärmeabgabe untersucht und eine Abnahme von Glykogen festgestellt. Eine Untersuchung des Harns auf abnorme Produkte liegt noch nicht vor.

Dagegen sind an niederen Tieren eine Reihe von solchen Stoffwechseluntersuchungen ausgeführt worden.

Bunge[4]) hat in den Eingeweidewürmern Tiere gefunden, die normaler Weise ohne O leben. Er verwendete den im Dünndarm der Katze lebenden Spulwurm, Ascaris mystax, der relativ widerstandsfähig ist und sich lebhaft bewegt. Ein 10 *cm*³ langes, 12 *cm*³ fassendes Reagensglas wird etwa zu einem Drittel mit Hg gefüllt; das Hg wird gekocht. Sobald es sich ein wenig abgekühlt hat, wird der übrige Raum mit 1%iger NaCl-Lösung gefüllt. Auch diese Lösung wird durch Kochen von Luft befreit. Sobald die Lösung auf Körpertemperatur abgekühlt ist, werden Spulwürmer, die dem Darm einer soeben getöteten Katze entnommen sind, in das Reagensglas gebracht;

---

[1]) *Koeninck*, Versuche und Beobachtungen an Fledermäusen. Arch. f. Anatomie u. Physiol. Abt. f. Physiol. 1899. S. 389.

[2]) *Pflüger*, Physiologische Verbrennung im lebenden Organismus. Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. **10**. S. 251 (1875).

[3]) *E. Lesser*, Das Verhalten des Glykogens der Frösche bei Anoxybiose und Restitution. Zeitschr. f. Biol. Bd. **56**. S. 467 (1911).

[4]) *Bunge*, Das Sauerstoffbedürfnis der Darmparasiten. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 8. S. 48 (1883). — Weitere Untersuchungen über die Atmung der Würmer. Ebenda. Bd. **14**. S. 318 (1889).

dieses wird dann mit dem Daumen verschlossen, umgekehrt, in eine Hg-Wanne getaucht und, in senkrechter Stellung fixiert, bei 35—39° gehalten. Die Tiere bleiben 4—6 Tage am Leben. Versuche, die Tiere durch Halten in Nährlösungen länger am Leben zu erhalten, scheiterten daran, daß die Lösungen sich bakteriell zersetzten.

Die größte der bekannten Ascarisarten, A. megalocephala des Pferdes, erwies sich leider als sehr wenig resistent.

Als sehr bequemes Versuchsobjekt bezeichnet *Bunge* die im Darm des Hechtes lebende Ascaris acus, weil sie bei Zimmertemperatur am Leben erhalten werden kann (4—6 Tage).

Die wichtigsten Untersuchungen sind an Ascaris lumbricoides aus dem Darm des Schweines angestellt. Schon *Bunge* fand, daß bei diesem Tier als Zersetzungsprodukt neben CO_2 eine flüchtige Fettsäure auftritt. *Weinland*[1]) konnte die Tiere aus dem Schlachthofe meist ziemlich reichlich erhalten. Vor Beginn des Versuches wurden sie in erwärmter NaCl-Lösung gewaschen und auf Filtrierpapier getrocknet. Dann wurden die Würmer in ein verschließbares Gefäß gebracht, das fast vollständig mit ausgekochter 1%iger NaCl-Lösung gefüllt war (gewöhnlich 30—90 *g* Ascaris in 700—900 *cm*³ Wasser). In dem fest verschlossenen Gefäße wurden sie bei Körpertemperatur, meist auch vor Licht geschützt gehalten, lebten so 4—6 Tage; durch Durchleiten von CO_2 kann man ihre Lebensdauer etwas verlängern. Soll der Gaswechsel untersucht werden, so bringt man die Tiere in einen fest verschlossenen, bis auf einen geringen Raum mit NaCl-Lösung gefüllten Kolben, in den zwei Glasröhren führen: die eine, bis auf den Boden reichende, dient zur Gaszufuhr; sie wird durch ein kleines Holzstückchen so weit verengt, daß die Tiere nicht hineinkriechen können; die andere Glasröhre reicht nur in den über der Flüssigkeit stehenden Gasraum und dient zur Abfuhr des Gases. Im übrigen ist die Versuchsanordnung so wie bei anderen Respirationsversuchen.

Auch außerhalb des Körpers lebende Würmer können unter anoxybiotischen Bedingungen gehalten werden, z. B. Anguillula aceti, Gordius aquaticus. Zu Versuchen geeignet ist auch der Blutegel.[2])

Lesser[3]) verwendete zu vergleichenden Versuchen über oxybiotischen und anoxybiotischen Stoffwechsel Regenwürmer, Lumbricus herculius Savign. (= L. terrestris L.) und Allolobophora foetida Savign. Die Tiere wurden

---

[1]) *Weinland,* Über den Glykogengehalt einiger parasitärer Würmer. Zeitschr. f. Biol. Bd. **41**. S. 69 (1901). — Über Kohlenhydratzersetzung ohne Sauerstoffaufnahmen bei Ascaris, einem tierischen Gärungsprozeß. Ebenda. Bd. **42**. S. 55 (1901). — Über die von Ascaris lumbricoides ausgeschiedene Fettsäure. Ebenda. Bd. **45**. S. 113 (1904). — Über die Zersetzung stickstoffhaltiger Substanzen bei Ascaris. Ebenda. Bd. **45**. S. 517 (1904).

[2]) *Pütter,* Der Stoffwechsel des Blutegels (Hirudo medicinalis). Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. **6**. S. 217 (1907).

[3]) *E. Lesser,* Chemische Prozesse bei Regenwürmern. I. Mitt. Zeitschr. f. Biol. Bd. **50**. S. 421 (1908). — II. Mitt. Ebenda. Bd. **52**. S. 282 (1909). — III. Mitt. Ebenda. Bd. **53**. S. 533 (1910). — IV. Mitt. Ebenda. Bd. **54**. S. 1 (1910).

von Fischern gesammelt. Um sie erdfrei zu machen, hält man sie in einem verdunkelten Raum in hohen, offenen Präparatengläsern, ohne Wasser und ohne Nahrung. Täglich werden sie einzeln mit destilliertem Wasser gewaschen, dann auf Fließpapier getrocknet und in ein reines Gefäß gesetzt. Nach 8—10 Hungertagen ist die Hauptmenge der Erde aus dem Darm ausgeschieden. Die Versuche werden im Hungerzustande durchgeführt. Zur Untersuchung des anoxybiotischen Stoffwechsels kommen die Tiere für 5—6 Stunden in den oben (S. 1242) zur Untersuchung von Fröschen bestimmten Rezipienten. Reiner N wird durchgeleitet, das austretende Gas analysiert. (Abbildung des verwendeten Respirationsapparates siehe Mitteilung IV, S. 4.) Außer der anoxybiotischen Periode wird auch die darauffolgende „Restitutionsperiode" untersucht. Durch Analyse der Tiere vor und nach dem anoxybiotischen Versuch läßt sich eine starke Abnahme des Glykogens nachweisen; gleichzeitig häuft sich in den Tieren eine flüchtige Fettsäure, wahrscheinlich Valeriansäure an, die als Abbauprodukt des Glykogens anzusehen ist. Wichtig ist, daß in der Restitutionsperiode der respiratorische Quotient erhöht ist; das macht es unwahrscheinlich, daß die während des Lebens ohne Sauerstoff abgelagerte Fettsäure nachher vollständig oxydiert wird. Das spricht gegen die Annahme, daß der anoxybiotische Stoffwechsel als ein wegen des O-Mangels vorzeitig abgebrochener normaler Stoffwechselvorgang zu deuten ist.

Sehr zahlreiche Untersuchungen über den Stoffwechsel unter anoxybiotischen Verhältnissen sind an der Hefe und an höheren Pflanzen ausgeführt.[1])

L. Andere Stoffwechselstörungen.

Es gibt noch eine große Reihe von Stoffwechselstörungen, die bisher zum Studium des intermediären Stoffwechsels noch nicht herangezogen werden konnten. Zum Teil liegt das daran, daß die chemische Natur des betreffenden pathologischen Produktes noch nicht aufgeklärt ist (Körper der *Ehrlich*schen Diazoreaktion, Substanz der *Charcot-Leyden*schen Kristalle), zum Teil daran, daß es sich mehr um quantitative als um qualitative Änderungen des Stoffwechsels handelt. Dies dürfte z. B. in der Hauptsache für diejenigen Krankheiten gelten, welche mit einem pathologisch gesteigerten Eiweißzerfall einhergehen (Fieber, Karzinose, *Basedow*sche Krankheit, verschiedene Vergiftungen). Die Erwartung, daß man in diesen Fällen im Harn unvollständig zersetzte Produkte des intermediären Stoffwechsels auffinden würde, hat sich im allgemeinen nicht erfüllt, wenn auch gewisse Befunde [wie das veränderte Verhältnis von C:N im Harn[2]) und die erhöhte Oxyproteinsäureausscheidung bei Karzinose[3])] darauf hinweisen, daß solche, derzeit aber noch nicht genügend bekannte Produkte vorkommen können. In manchen mit gesteigertem Eiweißzerfall einhergehenden pathologischen Prozessen (Oxalsäurevergiftung, Phlorhizinvergiftung, Krebskrankheiten usw.) hat man eine Vermehrung der Phenole und des Indoxyls des Harns gefunden und diese Substanzen als Produkte eines abnormen

---

[1]) Literatur siehe bei *Lesser*, „Das Leben ohne Sauerstoff". Erg. d. Physiol. Jg. 8. S. 742 (1909).

[2]) *Magnus-Alsleben*, Über die Ausscheidung des Kohlenstoffs im Harn. Hab.-Schrift. Berlin. 1909.

[3]) *Salomon* und *Saxl*, Über einen Harnbefund bei Karzinomatösen. Beitr. z. Karzinomforschung. Heft 2. 1910.

Eiweißzerfalls gedeutet. Doch ist diese Deutung sehr anfechtbar und kann zur Aufklärung des intermediären Stoffwechsels nicht verwertet werden.

Auch bei der Steigerung des Purinstoffwechsels, wie sie z. B. bei der Leukämie beobachtet wird, und wie sie auch künstlich durch Röntgenbestrahlung erzeugt werden kann, sind nur quantitative Veränderungen des Stoffwechsels bekannt geworden.

Etwas Ähnliches gilt von den Stoffwechselstörungen, die bei den Erkrankungen der „Drüsen mit innerer Sekretion" eintreten, wenn man von der Zuckerausscheidung absieht.

Auch die urämische Stoffwechselstörung hat sich bisher zur Entscheidung von Fragen des intermediären Stoffwechsels nicht heranziehen lassen.

III. Untersuchungen an isolierten Organen.

Versuche an isolierten Organen können die Untersuchungen am intakten Organismus ergänzen und kontrollieren. Sie bieten den Vorteil, daß zur völligen Zersetzung der Körpersubstanzen wohl häufig die Mitwirkung mehrerer Organe nötig ist, und daß infolgedessen in isolierten Organen leichter intermediäre Produkte gefaßt werden können; so geht die Zersetzung der Buttersäure, des Leuzins in der isolierten Leber nicht bis zu CO_2 und H_2O, sondern nur bis zur Stufe der Acetessigsäure; bei der Zersetzung von Zucker und Alanin durch die überlebende Leber entsteht Milchsäure, die wohl auch im intakten Organismus entstehen dürfte, hier aber weiter verbrannt wird. Ferner geben die Untersuchungen an einzelnen Organen gleichzeitig Aufschluß über die Lokalisation der gefundenen Stoffwechselvorgänge. Ein Nachteil dieser Methoden ist es, daß ein aus dem Zusammenhang mit den übrigen Körperteilen gerissenes Organ nicht mehr als völlig normal betrachtet werden kann, und daß sich auch bei den besten Verfahren sehr bald Absterbeerscheinungen geltend machen. Man wird also immer darauf gefaßt sein müssen, daß die hier beobachteten Vorgänge von den normalen Lebenserscheinungen abweichen.

Wenn man von der bereits oben besprochenen sofortigen chemischen Untersuchung frischer Organe absieht, kommen am frischen Organe zwei prinzipiell verschiedene Methoden in Betracht: die Untersuchung des durch künstliche Zirkulation und Respiration überlebend gehaltenen Organes (Durchströmungsmethode) und die Untersuchung des völlig isolierten, sich selbst überlassenen Organs (Autolyse). Dazu kommt noch die Untersuchung der fermentativen Eigenschaften von Organpulvern und Organextrakten.

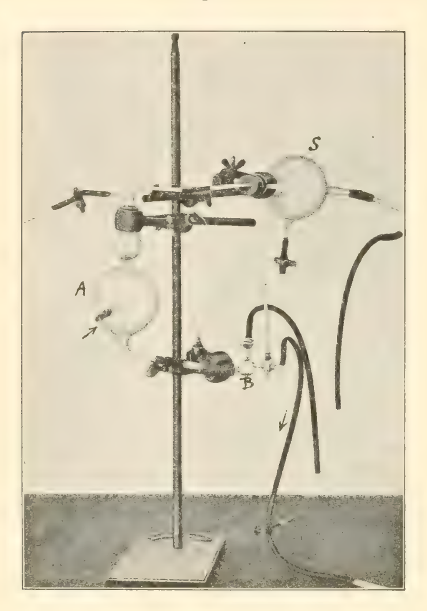
A. Durchströmungsmethoden.

Diese Methoden streben an, das isolierte Organ möglichst vollkommen „überlebend" zu erhalten. Das Organ soll in gleicher Weise arbeiten wie im intakten Organismus, abgesehen von den Wechselbeziehungen zu anderen Organen, mit Ausnahme des Blutes. Die gebräuchlichen Durchströmungsapparate sind in diesem Werke, Bd. III, S. 521 beschrieben.

Eine neue Form des *Brodie*schen Apparates, welche das Arbeiten mit kleinen Blutmengen gestattet, und deshalb besonders dann von Vorteil ist, wenn man Organe kleinerer Tiere mit arteigenem Blut speisen will, ist von *Friedmann*[1]) angegeben worden.

Der Hauptunterschied gegenüber dem ursprünglichen *Brodie*schen Apparat besteht in der Ausführung des Blutreservoirs. Dieses (s. Fig. 268 *A*) besteht aus zwei aneinander geschmolzenen und durch ein engmaschiges Silbernetz voneinander getrennten Glaskugeln. Es befindet sich in einem mit Wasser gefüllten Wärmekasten, der zwei mit Gummistopfen versehene Öffnungen zum Eintritt der Zuleitungs- und Ableitungsröhren besitzt. Das Blut strömt in die untere größere Kugel des Blutreservoirs ein und fließt durch ein an dem tiefsten Punkt angeschmolzenes, rechtwinkelig gebogenes Ansatzstück wieder aus. Es passiert dann den Blasenfänger *B* (eine kleine Kugel, in die zwei gebogene, kapillar ausgezogene Röhren münden, das zuführende an der höchsten, das abführende an der tiefsten Stelle der Kugel; Luftblasen können durch einen angeschmolzenen Glashahn aus dem Blasenfänger entfernt werden); darauf gelangt es in eine kleine Ausbuchtung mit einem Thermometer und dann in

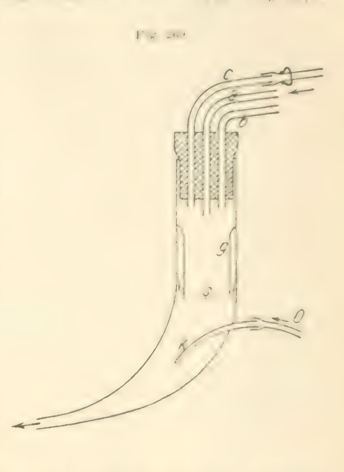
Fig. 268.



das Organ. Das aus dem Organ abfließende Blut strömt durch einen Gummischlauch und ein Glasrohr *(a)* in einen rechtwinkelig gebogenen Vorstoß (s. Fig. 269). In diesen führen noch zwei andere Röhren: die eine von ihnen *(b)* dient dazu, das aus dem Blasenfänger abgelassene und das von dem Organ äußerlich abtropfende, in einem Zylinder gesammelte Blut anzusaugen; die andere, mit Gummischlauch und Quetschhahn armierte *(c)* vermittelt die Kommunikation mit der äußeren Luft. Der Vorstoß enthält ein leicht auswechselbares, mit Gummi an eine kurze weite Glasröhre *(g)* befestigtes Gazesieb *(s)*, das dazu bestimmt ist, feine Gerinnsel zurück-

[1]) *E. Friedmann*, Zur Technik der Durchströmung überlebender Organe. Biochem. Zeitschr. Bd. 27. S. 87 (1910).

zuhalten. In den unteren Teil des Vorstoßes ist eine Kapillare (*k*) eingeschmolzen, durch die der O während der Durchblutung eingeleitet wird. Das verjüngte Ende des Vorstoßes führt das Blut zur Pumpe zurück. Die obere kleinere Kugel des Blutreservoirs *A* (s. Fig. 268) dient zum Abfangen des ersten Schaums. In ihrem Hals befindet sich ein doppelt durchbohrter Gummistopfen, durch dessen eine Bohrung ein rechtwinkelig gebogenes, kapillar ausgezogenes Rohr auf die tiefste Stelle der unteren Kugel führt. Es dient als Ansatzstück beim Einleiten des Sauerstoffes zu Beginn der Durchblutung, bis der gewünschte Druck hergestellt ist. Durch die zweite Bohrung geht ein kuzes, mit einem Gummistopfen versehenes Rohr, das in den Hals des Schaumreservoirs *S* mündet. Dieses ist eine Glaskugel, die noch zwei Ansatzstücke trägt: eines an ihrem tiefsten Punkte zum Ablassen des aus dem Schaum sich absetzenden Blutes und ein zweites an ihrem höchsten Punkte, das in den Hals der Saugflasche mündet, in der gegebenen Falles noch übersteigender Schaum aufgefangen wird, und die mit einem Überdruckventil und einem Manometer verbunden ist.



Ein weiterer Vorteil des *Friedmann*schen Apparates besteht darin, daß die Durchblutungspumpe (Konstruktion derselben siehe das Original) nicht, wie das beim *Brodie*schen Apparat der Fall ist, mit den übrigen Teilen in fester Verbindung steht.

Eines relativ einfachen, bei Vorhandensein eines Elektromotors leicht zu improvisierenden Apparates bedienten sich *O. Neubauer* und *Groß*.[1] Als „Herz" verwenden sie ein einfaches Klysopomp *H*, das durch einen Elektromotor vermittelst eines Exzenters *E* rhythmisch komprimiert wird. Zwischen „Herz" und Organ ist ein Manometer *M* und ein Luftfänger *L* eingeschaltet, der gleichzeitig zur Messung der Bluttemperatur dient. Das abfließende Blut wird durch Einleitung von O aus einer Bombe arterialisiert und in einer *Woulf*schen Flasche mit 3 Tubussen aufgefangen. Aufsätze wirken als Schaumfänger (s. Fig. 270).

Die Menge des durchströmenden Blutes soll den Verhältnissen im lebenden Organismus möglichst entsprechen. Zur Richtschnur seien die durch 100 *g* Organ pro Minute strömenden Blutmengen zusammengestellt.

[1] *Otto Neubauer* und *Walther Groß*, Über den Tyrosinabbau in der künstlich durchbluteten Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 67. S. 219 (1910).

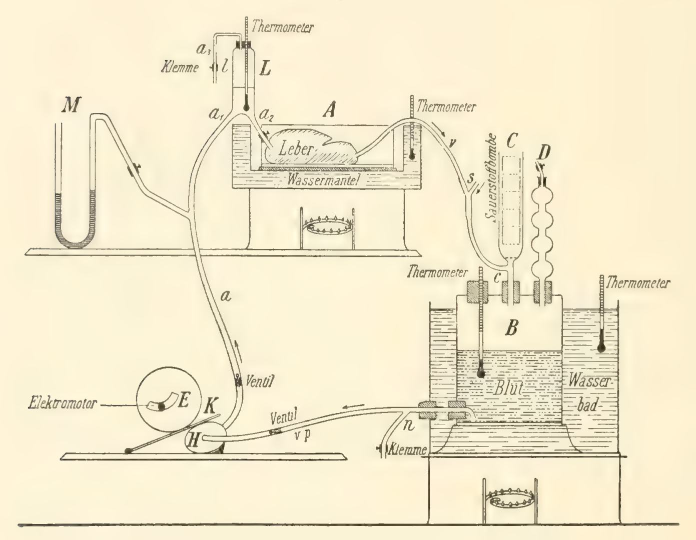
Für das Gesamttier, also für Aorta respektive A. pulmonalis, hat *Zuntz*[1]) beim Pferde berechnet:

in der Ruhe . . . . 8·3 cm^3
bei mittlerer Arbeit . . . . 15·2 „
bei maximaler Arbeit . . . . 70 „

Für das Herz des Hundes geben *Bohr* und *Henriques*[2]) an:

im Mittel . . . . 30 cm^3

Fig. 270.



Für den Skelettmuskel (nach *Chauveau* und *Kaufmann*[3]):

in der Ruhe . . . . 16 cm^3
bei der Arbeit . . . . 76 „

Für die Niere des Hundes fanden *Landergren* und *Tigerstedt*[3]):

nach 24stündigem Hungern . . . . 50 cm^3
nach Einführen harntreibender Mittel . . . . 96 „

Für die Leber (Pfortader) berechnet Ref. aus den Zahlen von *Beck*[4]) . . . . 70 „

---

[1]) *Zuntz*, Der Stoffwechsel des Pferdes. Berlin 1898.

[2]) *Bohr* und *Henriques*, Über die Blutmenge, welche den Herzmuskel durchströmt. Skandinav. Archiv f. Physiol. Bd. **5**. S. 232 (1895).

[3]) *Landergren* und *Tigerstedt*, Studien über die Blutverteilung im Körper. II. Abhandlung. Skandinav. Archiv f. Physiol. Bd. **4**. S. 241 (1893).

[4]) *Salaskin*, Über das NH_3 in physiologischer und pathologischer Hinsicht und die Rolle der Leber im Stoffwechsel N-haltiger Substanzen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **5**. S. 2448 (1898).

Untersuchungen an solchen künstlich durchströmten Organen können in mannigfacher Weise zur Aufklärung intermediärer Stoffwechselprozesse dienen. Durchströmungsversuche ohne weiteren Zusatz sind imstande, die rein analytischen Untersuchungen frischer Organe zu ergänzen. In künstlich durchbluteten Organen häufen sich mitunter Zwischenprodukte, die sonst weiter verbrannt werden, in größerer Menge an und werden so leichter nachweisbar: z. B. Acetessigsäure [1]), Milchsäure [2]), Harnsäure, Zucker. [3])

Weitere Aufklärungen können Versuche bringen, in welchen dem durchströmenden Blute Substanzen zugesetzt werden, z. B. solche, welche als intermediäre Produkte bereits bekannt sind und deren Übergang in andere Substanzen man prüfen will, z. B. Übergang in Glykogen [4]), Milchsäure, Acetessigsäure [5]), Oxybuttersäure [6]), Harnstoff [7]), Aminosäuren [8]), Harnsäure. [9]) Durch vergleichende quantitative Untersuchung des Blutes vor und nach der Durchströmung wird festgestellt, ob die zugesetzte Substanz angegriffen worden ist, und ob das vermutete Endprodukt an Menge zugenommen hat. Als Kontrollversuche müssen Durchströmungen ohne Zusatz in genügender Zahl angestellt werden. Ferner muß auch das durchströmte Organ selbst untersucht werden, zur Kontrolle auch gleichartige nicht durchströmte Organe.

Durchblutungen mit körperfremden Substanzen können — ähnlich wie die Einführung körperfremder Substanzen in den Gesamtorganismus — dazu dienen, um die chemischen Methoden kennen zu lernen, welche dem Organismus zur Verfügung stehen. [10])

---

[1]) *Embden* und *Lattes*, Über die Acetessigsäurebildung in der Leber des diabetischen Hundes. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **11**. S. 337 (1908).

[2]) *Wyssokowitsch*, Archiv f. (Anat. u.) Physiol. 1887. Suppl. S. 91.

[3]) *G. Embden*, Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **6**. S. 44 (1904).

[4]) *E. Külz*, Über Glykogenbildung im künstlich durchbluteten Muskel. Zeitschr. f. Physiol. Bd. **27**. S. 237 (1890). — Weitere Literatur s. unten.

[5]) Literatur s. unten!

[6]) *Friedmann* und *Maase*, Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. XII. Mitt. Biochem. Zeitschr. Bd. **27**. S. 474 (1910).

[7]) *v. Schröder*, Über die Bildungsstätte des Harnstoffs. Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm. Bd. **15**. S. 364 (1882). — Die Bildung des Harnstoffes in der Leber. Ebenda Bd. **19**. S. 373 (1885). — *Salomon*, Über die Verteilung der Ammoniaksalze im tierischen Organismus und über den Ort der Harnstoffbildung. *Virchows* Archiv. Bd. **97**. S. 149 (1884). — *Schoendorff*, In welcher Weise beeinflußt die Eiweißnahrung den Eiweißstoffwechsel? Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **54**. S. 420 (1893).

[8]) *Embden* und *Schmitz*, Über synthetische Bildung von Aminosäuren in der Leber. Biochem. Zeitschr. Bd. **29**. S. 423 (1910).

[9]) *Kowalewsky* und *Salaskin*, Über die Bildung von Harnsäure in der Leber der Vögel. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **33**. S. 210 (1901). — Siehe auch *Friedmann* und *Mandel*, Über die Bildung der Harnsäure in der Vogelleber. Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm. Supplementband. 1908. Festschrift f. *Schmiedeberg*. S. 199.

[10]) *Friedmann*, Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. 5. Mitt. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **11**. S. 151 (1902); 7. Mitt. ebenda. Bd. **11**. S. 365 (1908); 8. Mitt. ebenda. Bd. **11**. S. 371 (1908).

Vor den Experimenten am intakten Organismus haben diese Versuche den Vorteil, daß sie gleichzeitig auch über den O r t der beobachteten chemischen Prozesse Aufklärung bringen. So wurde mittelst der Durchblutungsmethode für die Leber allein festgestellt: $\overset{+}{U}$-Synthese[1]), $\overset{-}{U}$-Bildung[1]), oxydative Desamierung[2]), Reduktion von α-Ketonsäuren[2]), Abspaltung von CO_2[2]), Acetylierung[3]), Ätherschwefelsäurepaarung[4]), Hippursäuresynthese[5]), Synthese von Oxybuttersäure aus Acetaldehyd.[6])

Einige wichtige Versuchsanordnungen mit Anwendung der Durchblutungsmethoden seien im folgenden beschrieben:

1. Glykogenbildung in der Schildkrötenleber.[7])

Unter den Kaltblütern ist die europäische Landschildkröte, Testudo europaea, zur Ausführung von Leberdurchblutungen brauchbar, speziell zu Untersuchungen über Glykogenbildung wurde dieses Objekt empfohlen. Das 1—1¼ *kg* schwere Tier wird in Rückenlage fixiert; die Verbindung zwischen Haut und Brustschild wird mit der Säge durchtrennt; nachdem dann alle Verbindungen mit der Haut vorn und hinten mit einem scharfen Messer durchschnitten, und ebenso alle Muskeln an der Innenfläche des Brustschildes gelöst sind (das Messer muß dabei, um stärkere Blutung zu vermeiden, dicht dem Knochen entlang geführt werden), wird das Bruststück entfernt. Man sieht nun das unversehrt gebliebene Peritoneum mit den beiden, das Blut in die Leber führenden Venae umbilicales. Man unterbindet sie an der Stelle, wo sie zur Leber aufsteigen und bindet in die linke eine Glaskanüle ein, durch welche später die Durchströmungsflüssigkeit einfließen kann. Dann wird der Herzbeutel eröffnet und in das mittlere der drei Gefäße des Bulbus arteriosus eine Kanüle so weit eingeführt, daß ihre Spitze im Ventrikel selbst liegt. Aus ihr fließt bei der Durchströmung das Blut aus. Hierauf wird der rechte Leberlappen vorsichtig von seinen Verbindungen gelöst, eine Partie desselben mit einem schmalen Band abgebunden, abgeschnitten (mit Schonung des ziemlich weit nach rechts reichenden Sinus venosus), gewogen, sein Glykogengehalt bestimmt. Als

---

[1]) Literatur s. oben.

[2]) *O. Neubauer* und *H. Fischer*, Beiträge zur Kenntnis der Leberfunktionen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **67**. S. 230 (1910).

[3]) *O. Neubauer* und *O. Warburg*, Über eine Synthese mit Essigsäure in der künstlich durchbluteten Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **70**. S. 1 (1910).

[4]) *Embden* und *Glaessner*, Über den Ort der Ätherschwefelsäurebildung im Tierkörper. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **1**. S. 310 (1902).

[5]) *E. Friedmann* und *H. Tachau*, Über die Bildung des Glykokolls im Tierkörper. I. Biochem. Zeitschr. Bd. **35**. S. 88 (1911).

[6]) *E. Friedmann*, Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. 5. Mitt. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. **11**. S. 202 (1908).

[7]) *K. Grube*, Untersuchungen über die Bildung des Glykogens in der Leber. Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **118**. S. 1 (1907). — Über die kleinsten Moleküle, welche die Leber zur Synthese des Glykogens verwerten kann. Ebenda. Bd. **121**. S. 636 (1908).

Durchleitungsflüssigkeit dient *Ringer*sche Lösung (1 *l* enthält 6 *g* NaCl, 0·2 KCl, 0·2 $CaCl_2$, 0·1 $NaHCO_3$), der die zu prüfenden Stoffe zugesetzt werden. Die Durchströmungsflüssigkeit befindet sich in einer Flasche, die unten mit einem Tubus versehen ist und auf einem verstellbaren Stativ steht; die Durchleitung geschieht bei einem Druck von 150—200 *mm* Wasser. Die Schnelligkeit der Durchströmung wird durch die Herztätigkeit selbst reguliert. Nach 2—3 Stunden wird die Durchleitung beendet, der durchströmte Leberlappen aus seinen Verbindungen gelöst, gewogen und zur Glykogenbestimmung angesetzt. Bei der Deutung der Versuche ist zu berücksichtigen, daß der Unterschied in dem Glykogengehalt beider Leberlappen von vornherein ziemlich groß sein kann (bis zu 32%[1]).

2. Acetessigsäurebildung in der Hundeleber (nach *Embden*[2]).

Ein etwa 6—9 *kg* schwerer Hund (letzte Fütterung vor 24 Stunden) wird in leichter Äthernarkose durch Verblutung aus beiden Femoralarterien getötet; die Leber wird herausgenommen und in den Durchströmungsapparat eingeschaltet. 8—10 Minuten nach dem Tode ist die Durchblutung im Gang. Als Durchblutungsflüssigkeit dienen 1600 cm^3 defibriniertes Rinderblut. Die zu untersuchende Substanz beginnt man zuzusetzen, sobald die Temperatur des durchströmenden Blutes 40° erreicht hat, was meist in etwa 5—7 Minuten der Fall ist; der Zusatz erfolgt portionenweise, innerhalb 20 Minuten. In genau gemessenen Teilen des Blutes vor und nach der Durchströmung werden Bestimmungen des Acetons ausgeführt; das Blut wird nach der von *Schenck* (dieses Werk, Band II, S. 184) für die Blutzuckerbestimmung angegebenen Methode mit HCl und Sublimat gefällt und in einem verschlossenen Gefäß aufbewahrt; 400—500 cm^3 des Filtrates, die etwa $66\frac{1}{2}$ cm^3 Blut entsprechen, werden bis annähernd auf die Hälfte ihres Volumens abdestilliert, und das Destillat nach *Messinger-Huppert* (siehe dieses Werk, Band III, S. 906) mit $\frac{n}{10}$-J-Lösung titriert. Eine getrennte Bestimmung von Aceton und Acetessigsäure ist möglich, aber im allgemeinen nicht nötig. Aus den gewonnenen Zahlen wird die Menge des während der Durchströmung gebildeten Acetons in Milligrammen berechnet. In Versuchen, in welchen kein Zusatz gemacht wurde, schwankt diese Menge zwischen 16 und 27 *mg*; eine wesentlich stärkere Steigerung bedeutet, daß die zugesetzte Substanz in Aceton (Acetessigsäure) übergegangen ist. Als solche Acetessigsäurebildner haben sich erwiesen[3]: Oxybuttersäure, Leuzin,

---

[1]) *Schöndorff* und *Grebe*, Zur Frage der Entstehung von Glykogen aus Formaldehyd. Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. **138**. S. 525 (1911).

[2]) *Embden* und *Engel*, Über die Acetessigsäure in der Leber. Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. **11**. H. 7 (1908).

[3]) *Almagia* und *Embden*, Über das Auftreten einer flüchtigen, jodoformbildenden Substanz bei der Durchblutung der Leber. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. **6**. S. 59 (1905). — *Embden* und *Kalberlah*, Über Acetonbildungen der Leber. Ebenda. Bd. 8. S. 121 (1906). — *Embden*, *Salamon* und *Schmidt*, Über Acetonbildung in der Leber. II. Mitteilung. Ebenda. Bd. 8. S. 129 (1906). — *Embden* und *Marx*, Über Acetonbildung in der

Leuzinsäure, Isovaleriansäure, Isoamylamin, Isoamylalkohol, Isovaleraldehyd, Isoleuzin, Methyläthylessigsäure, Tyrosin, Phenylalanin, Phenylmilchsäure, p-Oxyphenylbrenztraubensäure und Homogentisinsäure: eine große Reihe von anderen Stoffen vermehrte die Menge des Acetons nicht. Aus diesen Befunden ergeben sich wichtige Schlüsse auf die Wege des Abbaues von Fettsäuren und Aminosäuren im Organismus, Schlüsse, welche die am lebenden Objekt gewonnenen Resultate in glücklicher Weise bestätigen.

Neubauer und *Groß*[1]) ziehen es vor, statt Rinderblutes das Blut des Versuchstieres zu verwenden. Die Tiere werden durch subkutane Morphiuminjektion betäubt, eine erhebliche Blutmenge aus der Arteria femoralis entnommen, defibriniert und im Verhältnis 1:2 mit *Ringer*scher Lösung und der Lösung der zu prüfenden Substanz verdünnt. Von dieser Flüssigkeit wird etwas mehr als das Dreifache des zu erwartenden Lebergewichtes (= 2·5 bis 4·0% des Körpergewichtes) abgemessen und in den Apparat gefüllt. Dann wird die Leber rasch herausgenommen, gewogen und in die Zirkulation eingeschaltet. Nach einigen Minuten wird der über das Dreifache des Lebergewichtes hinausgehende Überschuß an Strömungsflüssigkeit weggenommen; er dient zur Bestimmung des Acetongehaltes vor der Durchströmung. Für $^1/_3$ *kg* Leber, entsprechend 1 *l* Durchströmungsflüssigkeit, wurde z. B. in zwei Kontrollversuchen ohne Zusatz gefunden: vor der Durchströmung 16·9 respektive 10·4 *mg* Aceton; nach 90 Minuten dauernder Durchströmung 33·8 respektive 25·9 *mg*.

3. Bildung von Milchsäure in der Hundeleber (nach *Embden*[2])

An künstlich durchbluteten Lebern läßt sich feststellen, daß Milchsäure aus Kohlenhydraten (Glykogen, Traubenzucker, Lävulose), ferner aber auch aus dem Eiweißspaltungsprodukt Alanin, sowie aus Glycerin entstehen kann.

Zunächst läßt sich zeigen, daß bei der Durchblutung der stark glykogenhaltigen Leber mit defibriniertem Rinderblut während 1 bis 2 Stunden der Gehalt des Blutes an Milchsäure sehr erheblich zunimmt. Bei der Durchblutung der glykogenfreien oder der sehr glykogenarmen Leber mit Blut ohne besonderen Zusatz kommt es nicht zu einer Milchsäurevermeh-

Leber. III. Mitt. Ebenda. Bd. **11**. S. 318 (1908). — *Embden* und *Engel*, Über Acetsäurebildung der Leber. Ebenda. Bd. **11**. S. 323 (1908). — *Embden*, Über das Verhalten der optisch isomeren Leuzine in der Leber. Ebenda. Bd. **11**. S. 348 (1908). — *Wirth*, Über den Abbau des Isoleuzins in der Leber. Biochem. Zeitschr. Bd. **27**. S. 20 (1910). — *Sachs*, Über den Chemismus des Leuzinabbaues in der Leber. Ebenda. Bd. **27**. S. 27 (1910). — *Schmitz*, Über das Verhalten der p-Oxyphenylmilchsäure und der p-Oxyphenylbrenztraubensäure in der überlebenden Leber. Ebenda. Bd. **28**. S. 117 (1910).

[1]) *Neubauer* und *Groß*, Zur Kenntnis des Tyrosinabbaues in der künstlich durchbluteten Leber. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **67**. S. 219 (1910).

[2]) Die Technik dieser wichtigen Methode ist bisher noch nicht veröffentlicht worden; Herr Prof. *G. Embden* war so liebenswürdig, die nachfolgende Beschreibung für dieses Werk zur Verfügung zu stellen.

rung, im Gegenteil öfters zu einer ganz wesentlichen Verminderung der von vornherein im Blute vorhandenen Milchsäure.

Vorbereitung der Versuchstiere.

Für die Versuche werden Hunde im Gewichte von etwa 7—10 *kg* angewendet. Ihre Vorbereitung zum Versuch ist verschieden, je nachdem der Versuch an der glykogenreichen oder an der glykogenfreien Leber angestellt werden soll.

Zur Erzielung einer glykogenreichen Leber werden die Tiere zunächst mit einer reichlichen, gemischten Kost ernährt. 2—2½ Tage vor dem Versuch wird mit der Verabreichung großer Rohrzuckermengen in konzentrierter wässeriger Lösung mittelst Schlundsonde begonnen. Pro Tag erhalten die Tiere etwa 300—400 *g* Rohrzucker. Während der letzten 24 Stunden wird außer Rohrzucker keine Nahrung verabreicht. Die letzte Rohrzuckergabe erfolgt etwa 3—5 Stunden vor dem Versuch. Der Glykogengehalt der Leber ist alsdann ein sehr hoher (bis 20% des feuchten Lebergewichts). Es gibt Hunde, die auf die Rohrzuckereingießung mit starken Durchfällen reagieren. Diese sind zum Versuche ungeeignet.

Die Durchströmung der abnorm glykogenhaltigen Leber bietet keine besonderen Schwierigkeiten. Nur muß man bei der Vorbereitung der Durchblutung die Leber besonders schonend behandeln, da der hohe Glykogengehalt das Organ sehr zerreißlich macht.

Die Vorbereitungen eines Versuchs an der glykogenfreien Leber sind nicht ganz so einfach. Um glykogenfreie Hundelebern zu erhalten, wurde die Methodik befolgt, die *G. Embden* schon früher beim Studium der Zuckerbildung in der überlebenden Leber verwendet hat.[1]) Der Hund erhält 3 Tage vor dem Versuch keine Nahrung (dagegen Wasser). Unmittelbar vor dem Versuch wird das Tier mit Strychnin vergiftet. Es erhält zunächst etwa 1 *mg* Strychnin. nitricum subkutan. Die Krämpfe sollen nur ganz allmählich einsetzen. Sobald sie stärker werden, wird an dem vorher in Äthernarkose tracheotomierten Tier künstliche Atmung eingeleitet.

Sind 40 Minuten nach der ersten Strychnininjektion deutliche Krämpfe (oder wenigstens eine sehr starke Steigerung der Reflexerregbarkeit) noch nicht eingetreten, so wird nochmals 1 *mg* oder 0·5 *mg* gegeben. Größere Dosen führen leicht zum Tode während des ersten stärkeren Krampfanfalles.

Hat das Tier 1—1½ Stunden Krämpfe gehabt, so wird es, falls nicht während dieser Zeit der Tod spontan eingetreten ist, durch Entbluten aus den Femoralgefäßen getötet.

Vor der Durchblutung wird ein kleines Läppchen der Leber mit einem nassen, starken Bindfaden abgebunden und mit der Schere abgetrennt. Mit dem Läppchen (dessen Gewicht mindestens 10—15 *g* betragen

---

[1]) *G. Embden,* Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber. Beiträge z. chem. Phys. u. Path. Bd. 6. S. 44 (1904).

soll) wird sofort eine Glykogenbestimmung nach *Pflüger* angesetzt. War die Vorbereitung des Tieres richtig, so läßt sich Glykogen in dem Läppchen nicht oder nur in Spuren nachweisen.

In neuerer Zeit hat sich herausgestellt, daß die Milchsäurebildung bei der Durchblutung der Leber nicht nur dann ausbleibt, wenn das Organ glykogenfrei, sondern auch, wenn es recht glykogenarm ist. Es scheint, daß im allgemeinen einfacher viertägiger Hunger ohne Strychninisierung einen ausreichenden Grad von Glykogenarmut hervorruft. Doch möchten wir dieses Verfahren vor Anstellung weiterer zahlreicher Versuche nicht als sicher bezeichnen.

Bekanntlich kann man durch Phlorhizinverabreichung an Hungerhunde die Leber ziemlich leicht von Glykogen befreien. Es ist aber nicht zweckmäßig, sich dieses Verfahrens zu bedienen, weil die bei der Durchströmung der phlorhizindiabetischen Leber auftretenden erheblichen Mengen von β-Oxybuttersäure eine exakte Milchsäurebestimmung unmöglich machen.

Bestimmung der Milchsäure in Blut und Leber.

Blut und Leber werden in gleicher Weise verarbeitet. Die Enteiweißung des Blutes resp. der möglichst fein zerkleinerten Leber erfolgt nach *Schenck* (dieses Werk, Bd. II, S. 184) mit Salzsäure und Sublimat. Die gewonnenen Flüssigkeiten bleiben über Nacht im Eisschrank. Am nächsten Morgen wird abgenutscht (ohne Nachwaschen).

Die Filtrate werden mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber, dann sofort durch einen kräftigen Luftstrom von Schwefelwasserstoff befreit. Aliquote, gemessene Teile werden weiter verarbeitet. Die Milchsäurebestimmungen im Blute werden stets doppelt vorgenommen, und zwar gewöhnlich an je 1200 cm^3 Blutfiltrat, entsprechend 200 cm^3 Blut. Bei der Leber reicht das Material für Doppelbestimmungen im allgemeinen nicht aus. Die für die Einzelbestimmung abgemessene Filtratmenge wird mit starker Natronlauge genau neutralisiert und dann mit verdünnter Salzsäure ganz schwach angesäuert. Das ist nötig, weil sonst bei dem nun folgenden Einengen die Reaktion leicht alkalisch wird, wobei der stets im Filtrat vorhandene Zucker unter Bildung ätherlöslicher Säuren (speziell auch Milchsäure) zersetzt werden könnte.

Die Einengung des Filtrats erfolgt im Vakuum bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers bis auf etwa 100 cm^3. Die eingeengte Flüssigkeit muß völlig klar und nahezu farblos sein. (Trübung ist meist dadurch bedingt, daß die Lösung alkalisch geworden ist und infolgedessen die Phosphate ausgefallen sind.) Nachdem man sich nach der Einengung davon überzeugt hat, daß die Flüssigkeit neutral oder ganz schwach sauer reagiert (ist alkalische Reaktion eingetreten, so wird die Bestimmung verworfen), wird sie in einen Extraktionsapparat nach *Lind* (dieses Werk, Bd. 3, II, S. 931) übergespült, mit 15 cm^3 einer konzentrierten Phosphorsäurelösung (Gehalt an P_2O_5 ca. 60%) angesäuert, mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt und mit Äther extrahiert.

Die Extraktion wird nach 30 Stunden unterbrochen und die ätherische Lösung im Kolben weiterverarbeitet.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Extraktion wird ein neues Extraktionskölbchen mit dem Apparat verbunden und nochmals 10 Stunden extrahiert. In diesem zweiten Ätherextrakt läßt sich oft gar keine Milchsäure mehr nachweisen, manchmal sind noch minimale Spuren vorhanden.

Das erst gewonnene Extrakt bleibt kurze Zeit stehen und wird dann unter Nachwaschen mit Äther in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Etwa am Boden und den Wänden des Extraktionskölbchens haftenden Tröpfchen wässeriger Flüssigkeit werden die ätherlöslichen Substanzen und das Wasser durch öfters wiederholtes Schütteln mit nicht zu kleinen Äthermengen entzogen. Der filtrierte Ätherextrakt wird unter Zusatz von $20\,cm^3$ Wasser auf dem Wasserbade zur Verjagung des Äthers destilliert. Die gewonnene Flüssigkeit wird nach Zusatz von $200-300\,cm^3$ Wasser mit reinem Bleikarbonat[1]) im Überschuß versetzt und etwa eine Stunde auf dem lebhaft siedenden Wasserbade erwärmt. Die Flüssigkeit bleibt über Nacht im Eisschrank stehen und wird dann unter Dekantieren vom Bleiniederschlag und gründlichem Waschen mit kaltem Wasser filtriert. Durch die Bleibehandlung wird die stets bei der Ätherextraktion in nicht unerheblicher Menge mitgerissene Phosphorsäure quantitativ entfernt.

Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff entbleit, vom Sulfidniederschlag unter Nachwaschen mit heißem Wasser abfiltriert, durch einen Luftstrom vom Schwefelwasserstoff befreit und nun während einer Stunde mit reinem Zinkkarbonat[2]) erwärmt. Vom überschüssigen Zinkkarbonat wird unter Nachwaschen mit heißem Wasser abfiltriert, das Filtrat zunächst in einer Porzellanschale auf etwa $20\,cm^3$ eingeengt, dann von einem sich stets ausscheidenden Niederschlag — wiederum unter Nachwaschen mit heißem Wasser — nochmals abfiltriert und nunmehr in gewogenen Wägeschälchen auf ein kleines Volumen eingeengt. Die Kristallisation des Zinklaktats erfolgt im nicht evakuierten Exsikkator.

Bei manchen Versuchen (z. B. bei der Gewinnung von Zinklaktat aus Muskelpreßsaft oder aus Blut nach Durchströmung der glykogenreichen Leber) ist die Kristallisation des Zinklaktats sehr vollständig und eine Bestimmung des Kristallwassers und des Zinkgehaltes liefert völlig oder nahezu richtige Ergebnisse.

In anderen Fällen ist aber das Zinklaktat sehr stark verunreinigt und die Kristallisation eine sehr unvollkommene.

---

[1]) Auch die reinsten, im Handel vorkommenden Präparate von Bleikarbonat enthalten fast immer merkliche Mengen von wasserlöslichen, alkalisch reagierenden Verunreinigungen. Es ist unbedingt notwendig, die letzteren durch sehr oft wiederholte Behandlung des Präparats mit heißem Wasser zu entfernen, bis destilliertes Wasser mit einer Probe des Präparats geschüttelt, nach dem Filtrieren gegen empfindliches Lackmuspapier nicht mehr alkalisch reagiert.

[2]) Von den käuflichen Zinkkarbonatpräparaten gilt ganz das in Fußnote 1 für das Bleikarbonat Gesagte.

Es wird daher die Wägung des schließlich gewonnenen Zinksalzes stets nach Trocknung bei 107—108° bis zur Gewichtskonstanz vorgenommen. und außerdem an dem wieder aufgelösten Zinksalz eine Milchsäurebestimmung nach *v. Fürth* und *Charnass*[1]) ausgeführt.

Dieses Verfahren, das *v. Fürth* und *Charnass* ausarbeiteten, nachdem *Embden* die Unzulänglichkeit der aus dem Laboratorium *v. Fürths* veröffentlichten Methode *Jerusalems* dargetan hatte, beruht bekanntlich darauf, daß die Milchsäure bei schwefelsaurer Reaktion durch Kaliumpermanganat zu Acetaldehyd oxydiert wird. Der Acetaldehyd wird möglichst im Augenblick seiner Entstehung abdestilliert und in einer gekühlten Wasservorlage aufgefangen.

Die Titration des aus der Milchsäure gebildeten Aldehyds geschieht nach dem Verfahren von *Ripper*.

Hierbei wird eine gemessene, überschüssige Menge einer Kaliumbisulfitlösung[2]) von bekanntem Titer der Aldehydlösung zugefügt und nach genügend langem Stehen die nicht an Aldehyd gebundene Bisulfitmenge mit $\frac{N}{10}$-Jodlösung zurücktitriert.

Die Berechnung der Milchsäuremenge geschieht auf Grund folgender Überlegungen. Aus einem Molekül Milchsäure entsteht ein Molekül Aldehyd, das zu seiner Bindung ein Molekül Bisulfit erfordert. Ein Molekül Bisulfit verbraucht bei der Oxydation zu Schwefelsäure zwei Atome Jod.

Demzufolge entspricht ein Molekül Milchsäure 2 Atomen Jod, jeder Kubikzentimeter einer Normal-Jodlösung also einem halben Kubikzentimeter einer Normal-Milchsäurelösung. 1 cm^3 einer $\frac{N}{10}$-Jodlösung entspricht danach 4·5 *mg* Milchsäure.

v. Fürth und *Charnass* erhielten bei der Anwendung ihrer Methode auf reines milchsaures Lithium Aldehydwerte, die 86·1% bis 93·1% des angewendeten Laktats entsprachen; der mittlere, aus einer größeren Anzahl von Analysen ermittelte Fehler betrug annähernd 11%.

Durch einige Abänderungen gelingt es leicht, diese Methode ganz wesentlich exakter zu gestalten, so daß die Werte nur 7% bis 2% zu niedrig werden. Bei Milchsäuremengen von mindestens 0·08 *g* lassen sich Verluste, die 4% überschreiten, anscheinend mit Sicherheit vermeiden.

Auf die in Frage kommenden methodischen Versuche, welche von Herrn Apotheker *Schmidt* und Herrn Dr. *Max Oppenheimer* ausgeführt wurden, soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Es soll vielmehr nur das Verfahren, wie es jetzt bei allen Milchsäurebestimmungen nach *v. Fürth* und *Charnass* in unserem Laboratorium zur Anwendung kommt, kurz geschildert werden:

Das in der oben angegebenen Weise gewonnene, bis zur Gewichtskonstanz bei 107—108° getrocknete und gewogene, mehr oder weniger stark verunreinigte milchsaure Zink wird in heißem Wasser gelöst und in einen Kjeldahldestillationskolben von etwa 800 cm^3 übergespült. Auf etwa ungelöst bleibende Verunreinigungen wird keine Rücksicht genommen. Die Lösung, deren Volumen nicht mehr als etwa 50 cm^3 betragen soll, und

---

[1]) *v. Fürth* und *Charnass*, Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure durch Ermittlung der daraus abspaltbaren Aldehydmenge. Biochem. Zeitschr. Bd. **96**. S. 199 (1910).

[2]) Nicht einer Kaliumhydrosulfitlösung, wie *v. Fürth* und *Charnass* an verschiedenen Stellen fälschlich angeben.

deren Milchsäuregehalt zweckmäßig nicht größer sein soll als 0·2 *g*, wird mit 300 *cm*³ Schwefelsäure von 0·5% sowie etwas Talkum versetzt. Der Destillationskolben ist durch ein *Stutzer*sches Aufsatzrohr mit einem Schlangenkühler verbunden, dessen unteres Ansatzrohr in eine eisgekühlte Vorlage von 1 *l* Fassungsvermögen taucht. Die Vorlage enthält etwa 150 *cm*³ Wasser und außerdem eine gemessene Menge titrierter, annähernd ¹/₅ normaler Bisulfitlösung, die zur Bindung des bei der Oxydation mit Permanganat entstehenden Aldehyds mehr als ausreichen muß.

Die Kaliumpermanganatlösung tropft, wie *v. Fürth* und *Charnass* es angegeben haben, nachdem lebhaftes Sieden eingetreten ist und keine Luft mehr aus der Vorlage entweicht, aus einem Tropftrichter in die zu oxydierende Lösung.

Sehr wesentlich ist es, daß hierbei sehr stark verdünnte, und zwar $\frac{N}{100}$-Permanganatlösung angewandt wird. Bei Anwendung von $\frac{N}{10}$-Permanganatlösung gelangt man nur zu Aldehydausbeuten, wie sie auch *v. Fürth* und *Charnass* gewonnen haben.

Die Zahl der pro Minute zufließenden Tropfen $\frac{N}{100}$-Permanganatlösung soll etwa 90 bis 120 betragen. Die Flüssigkeit muß so lebhaft sieden, daß während der Oxydation keine erhebliche Volumänderung eintritt.

Durch den Talkumzusatz wird jeder Siedeverzug verhindert, was ebenfalls nicht unwesentlich sein dürfte.

Sobald sich — gegen Ende der Oxydation — die Flüssigkeit bräunlich zu färben beginnt, wird das Tempo des Zutropfens der Permanganatlösung möglichst verlangsamt und etwa 10 Minuten — unter langsam zunehmender Färbung der Flüssigkeit — weiterdestilliert. Dann wird die Destillation unter den üblichen quantitativen Kautelen unterbrochen und die nicht an Aldehyd gebundene Bisulfitmenge nach Stärkezusatz mit $\frac{N}{10}$-Jodlösung titriert.

Der Titer der Bisulfitlösung wird bei jeder Bestimmung neu festgestellt.[1] Die Differenz der bei dieser Titerstellung und der bei der eigentlichen Titration verbrauchten Anzahl Kubikzentimeter $\frac{N}{10}$-Jodlösung entspricht der vorhandenen Milchsäuremenge; jeder Kubikzentimeter $\frac{N}{10}$-Jodlösung entspricht, wie bereits oben erwähnt, 4·5 *mg* Milchsäure.

Wir haben im allgemeinen, wie aus dem Obenstehenden hervorgeht, vor Anwendung der Permanganatmethode die Milchsäure in Form ihres

---

[1] Durch einfaches, mehrstündiges Stehen einer stark verdünnten Bisulfitlösung (z. B. 20 *cm*³ $\frac{N}{5}$-Bisulfitlösung auf 150 *cm*³ Wasser) in eisgekühlter Vorlage findet eine Titeränderung nicht statt.

Zinksalzes — so gut wie möglich — isoliert und zur Wägung gebracht. Das ist überall da notwendig, wo man mit der Möglichkeit rechnen muß, daß die zu untersuchende Flüssigkeit neben Milchsäure noch andere ätherlösliche Substanzen enthält, die bei der Anwendung des Permanganatverfahrens in ähnlicher Weise wie Milchsäure flüchtige bisulfitbindende Substanzen bilden. Hat man sich bei einer bestimmten Versuchsanordnung davon überzeugt, daß solche Substanzen (z. B. β-Oxybuttersäure oder Brenztraubensäure) nicht auftreten, so kann man das Permanganatverfahren sehr wohl direkt auf das Ätherextrakt nach Entfernung des Äthers durch Destillation unter Wasserzusatz, Neutralisation der Flüssigkeit mit Natronlauge und starker Einengung (zur Entfernung von aus dem Äther stammenden Alkoholspuren) anwenden.

Sehr nützlich erweist sich die eben geschilderte Anwendung des Permanganatverfahrens auch bei der zur Kontrolle der Vollständigkeit der ersten Extraktion der Milchsäure mit Äther stets ausgeführten zweiten Extraktion.

ANHANG. Bestimmung der Milchsäure im Muskelpreßsaft.

Einfacher als Blut und Leber läßt sich — wegen seines größeren Milchsäurereichtums und seines geringeren Eiweißgehaltes — Muskelpreßsaft zur Milchsäurebestimmung vorbereiten. Er wird mit dem gleichen Volumen Salzsäure von 2% und Sublimat von 5% versetzt, wodurch stets völlige Enteiweißung eintritt. Das Filtrat kann nach der Befreiung von Quecksilber und Schwefelwasserstoff ohne vorhergehende Einengung — zweckmäßig nach Sättigung mit Ammonsulfat — im *Lind*schen Apparat bei phosphorsaurer Reaktion extrahiert werden. Die weitere Behandlung des Ätherextrakts bietet keine Besonderheiten.

Methoden zur Untersuchung des Gaswechsels von künstlich durchbluteten Organen siehe dieses Werk, Band III, S. 444.

Durchblutungen an pathologisch veränderten Organen könnten wichtige Aufklärungen über den krankhaft veränderten Stoffwechsel bringen, sind aber bisher nur in geringer Zahl ausgeführt worden.[1])

Auf ein sehr günstiges Objekt, bei welchem ohne künstliche Zirkulation der Stoffwechsel isolierter überlebender Warmblüterzellen untersucht werden kann, hat *Otto Warburg*[2]) aufmerksam gemacht: die Blutkörper-

[1]) *Embden* und *Lattes*, Über die Acetessigsäurebildung in der Leber des diabetischen Hundes. Beitr. z. chem. Phys. u. Path. Bd. **11**. S. 327 (1908). — *Griesbach*, Über Acetessigsäurebildung in der Leber des diabetischen Hundes. Biochem. Zeitschr. Bd. **27**. S. 34 (1910). — *Zuelzer*, Experimentelle Untersuchungen über den Diabetes. Berliner klin. Wochenschr. Bd. **44**. S. 474 (1907). — *Lattes*, Über die Zuckerbildung in der künstlich durchbluteten Leber Diabetischer. Biochem. Zeitschr. Bd. **20**. S. 215 (1900).

[2]) *Otto Warburg*, Zur Biologie der roten Blutzellen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **59**. S. 112 (1909). — Über Beeinflussung der Sauerstoffatmung. Bd. **70**. S. 313 (1911). — Ferner briefliche Mitteilung vom 19. Oktober 1911.

chen von Vögeln. Man kann Gänsen erhebliche Mengen von Blutkörperchen mittelst Kanüle aus der Flügelvene entnehmen, ohne sie zu töten (z. B. in 24 Tagen 660 *cm*³ Blut bei 10 Entnahmen). Um das Blut steril zu gewinnen, macht man am besten einen kleinen Hautschnitt, sticht dann die Kanüle einer 30 *cm*³ fassenden Glasspritze in die Vene und füllt nun die Spritze 2- oder 3mal, ohne dabei die Kanüle aus der Vene herauszuziehen; der Hautschnitt wird mit zwei Stichen vernäht. Wenn man mit einem starken Aderlaß beginnt (100 *cm*³), so treten sehr bald junge Zellen in die Blutbahn über; die Stoffwechselprozesse verlaufen gerade in solchen jungen Zellen intensiver.

Die Gerinnung kann durch Hirudin verhindert werden. Man kann auch das Fibrin durch Schütteln abscheiden. Durch Zentrifugieren mit 0·9%iger Kochsalzlösung oder *Ringer*scher oder *Friedenthal*scher Lösung[1]) kann man die Blutkörperchen rein erhalten. Über die Untersuchung der Sauerstoffatmung an diesem Objekt siehe das Original.

Über Untersuchungen an Seetieren siehe dieses Werk, Band III, S. 1064.

B. Untersuchungen an isolierten Organen ohne künstliche Zirkulation (Autolyse).

Sie sind technisch erheblich einfacher, erlauben Ausschluß der Bakterienwirkung durch aseptisches oder antiseptisches Arbeiten und können infolgedessen viel länger ausgedehnt werden als die Durchströmungsversuche. Auf der anderen Seite sterben die Organe der Warmblüter beim Weglassen der Zirkulation sehr rasch ab. Man glaubt jedoch zu der Annahme berechtigt zu sein, daß eine Reihe von Stoffwechselvorgängen, die während des Lebens eine Rolle spielen, auch noch nach dem Tode der Zelle eine Zeitlang weiter ablaufen; ja für manche fermentative Prozesse darf man voraussetzen, daß sie nach dem Absterben der Zellen und besonders nach der Vernichtung des morphologischen Aufbaues (durch Zerkleinerung, Verreibung mit Kieselgur usw.) sogar ausgiebiger verlaufen und — da andere Lebensprozesse in Wegfall kommen — zur Anhäufung intermediärer Pro-

---

[1]) *Ringer*sche Lösung s. dieses Werk, Bd. 3, I, S. 325 ff. Die *Friedenthal*sche Lösung enthält im Liter 6 *g* $NaCl$, 4 *g* $NaHCO_3$, 0·3 *g* KCl, 0·3 *g* $Ca(H_2PO_4)_2$ und 2 *g* Glukose; Δ = — 0·56°; bei Verwendung von Gänseblut muß sie, dessen niedrigerem osmotischen Druck entsprechend, verdünnt werden. Sie darf gegen Phenolphthalein nicht alkalisch reagieren. Beim Kochen in offenen Gefäßen nimmt sie alkalische Reaktion an und ist dann unbrauchbar. Tabletten zur Herstellung der *Friedenthal*schen Lösung können aus der Victoria-Apotheke, Berlin SW., Friedrichstraße 19 bezogen werden (*v. Szily* und *Friedenthal*, Über Reaktionsbestimmungen im natürlichen Serum und über Herstellung einer zum Ersatz des natürlichen Serums geeigneten Salzlösung. Arch. für [Anat. u.] Physiol. Jg. 1903. S. 550).

dukte führen. Man hat daher von solchen der Autolyse überlassenen Organen und Organbreien wichtige Aufschlüsse über den intermediären Stoffwechsel erwartet. Doch spricht manches dagegen, daß die am autolysierten Organ gefundenen Tatsachen ohne weiteres auf den lebenden Organismus übertragen werden dürfen; z. B. die Erfahrung, daß der Hauptprozeß bei der Autolyse, die Eiweißspaltung, erst einige Stunden nach dem Tode, gleichzeitig mit dem Eintritt der dem lebenden Gewebe fremden, sauren Reaktion einsetzt.[1])

Die Prozesse bei der Autolyse verlaufen zum weitaus überwiegenden Teil anoxybiotisch. Man hat auch versucht, durch Durchleiten von Luft oder O, mit oder ohne Blutzusatz, die Bedingungen denen des lebenden Organismus ähnlicher zu machen.

Über die Methodik der Autolyse siehe dieses Werk, Band III, S. 432.

Bei der einfachen Autolyse, also beim Stehenlassen des Organs ohne jeden Zusatz (abgesehen von einem Antiseptikum), beobachtet man hauptsächlich hydrolytische Prozesse (Spaltung von Eiweiß, Kohlenhydraten, Fett, Nukleinsäuren), daneben aber auch oxydative (Purinsubstanzen zu U und Allantoin) und reduktive (H-Entwicklung), sogar Synthesen (Buttersäurebildung?).

Weit zahlreicher sind noch die Prozesse, die man beim Zusatz verschiedener Substanzen (Körpersubstanzen und körperfremde Substanzen) zum Organbrei beobachten kann.

Eine sehr große Anzahl von derartigen Versuchsergebnissen, und zwar gerade von solchen, die für den intermediären Stoffwechsel von Bedeutung schienen, hat sich aber als irrtümlich (offenbar infolge von Analysenfehlern) herausgestellt. Weder der Nachweis der Bildung von Fett aus Zucker, noch der der Entstehung von Zucker aus Fett, ja nicht einmal die Sicherstellung einer Synthese von Fett aus Fettsäuren und Glyzerin in der Darmschleimhaut ist im Brei von Säugetierorganen bisher gelungen.[2])

Dagegen hat *Weinland*[3]) die Bildung von Fett aus eiweißartiger Substanz im Brei von Fliegenmaden festgestellt.

Die auf Pferdefleisch gezüchteten, in wenigen Tagen zu geeigneter Größe herangewachsenen Larven (s. S. 1154) werden zunächst gründlich gewaschen, in der Reibschale sorgfältig verrieben, etwa 15 Minuten lang, bis der Brei

[1]) *J. Pohl*, Über Allantoinausscheidung bei Intoxikationen. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 48. S. 367 (1902). — *H. Wiener*, Über den Einfluß der Reaktion auf autolytische Vorgänge. Zentralblatt f. Physiol. Bd. **19**. Nr. 11 (1905).

[2]) *Abderhalden* und *Rona*, Bildung von Zucker aus Fett. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **41**. S. 303 (1904). — *Frank* und *Ritter*, Einwirkung der überlebenden Dünndarmschleimhaut auf Seifen, Fettsäuren und Fett. Zeitschr. f. Biol. Bd. **47**. S. 249 (1906).

[3]) *Weinland*, Fett aus eiweißartiger Substanz im Brei von Calliphora-Larven. Zeitschr. f. Biol. Bd. **51**. S. 197 (1910).

homogen erscheint. Dann wird Witte-Pepton (gewöhnlich ungefähr die Hälfte) portionenweise unter Zusatz von etwas Wasser (gewöhnlich etwas mehr als Witte-Pepton) mit dem Larvenbrei so lange zusammengerieben, bis ein homogener, ziemlich dünner Brei von alkalischer Reaktion entstanden ist. Dieser wird auf Wagegläschen (zur Untersuchung der Gasentwicklung in Rezipienten) verteilt, gewogen und bei Zimmertemperatur oder im Brutschrank stehen gelassen. Zur Fettbestimmung werden die Proben bei 100° getrocknet und in der Mühle fein pulverisiert. Bakterienwirkung als Ursache von Fettzunahme erscheint dadurch ausgeschaltet, daß Kontrollversuche mit dem Inhalt von Saugmagen und Darm negativ ausgefallen sind.

Sehr erfolgreich waren Untersuchungen an autolysierenden Organen über den Abbau der Nukleinsäure, respektive der Purinbasen, siehe dieses Werk, Band III, S. 420.

Von besonderem Interesse ist die Oxydation von Bernsteinsäure zu Äpfelsäure [1]) durch überlebende Gewebe (*Battelli* und *Stern*).

Muskelgewebe vom Hund oder Pferd, 3—4 Stunden nach dem Tode des Tieres entnommen, wird in einer Fleischhackmaschine fein zerrieben und 5- oder 6mal mit Wasser gut ausgewaschen, indem man die doppelte Menge Wasser zusetzt, 5 Minuten lang kräftig durchschüttelt und gut durch ein Leinwandtuch preßt. Zu 100 *g* dieses Muskelrückstandes fügt man 500 cm^3 Wasser und 3 *g* Bernsteinsäure als Na-Salz. Die Gewebssuspension wird in eine große Flasche gebracht, diese mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe schnell evakuiert und dann mit O gefüllt, indem man sie mit einem O-Behälter in Verbindung setzt. Die Flasche wird dann bei 38—40° geschüttelt, bis die O-Aufnahme völlig aufhört, was oft schon in weniger als einer Stunde der Fall ist. Dann wird sie in siedendes Wasser getaucht, bis die Temperatur 90° erreicht hat. Man filtriert, fällt das Filtrat vollständig mit essigsaurem Blei aus, zentrifugiert, wäscht den Niederschlag in der Zentrifuge mehrmals mit 50%igem Alkohol, rührt den Niederschlag mit Wasser an, zersetzt ihn mit H_2S und verjagt den überschüssigen H_2S aus dem Wasserbad. Durch Zusatz von $Ba(OH)_2$ bringt man das Schwefelblei zur Abscheidung, filtriert dann und engt das Filtrat auf ein kleines Volumen ein; das äpfelsaure Ba setzt sich allmählich in Form von weißen Plättchen ab. Die entstehende Äpfelsäure wird zum Teil weiter oxydiert. Auch Fumarsäure und Zitronensäure werden durch Organbrei oxydiert. [2]) Diese Verbrennungen sind nach *Battelli* und *Stern* deshalb besonders interessant, weil es scheint, daß sie durch denselben Prozeß bewirkt werden, welcher auch der „Hauptatmung" der Gewebe zugrunde liegt. (S. dieses Werk, Bd. III, S. 444.)

[1]) *Battelli* und *Stern*, Oxydation der Bernsteinsäure durch Tiergewebe. Biochem. Zeitschr. Bd. **30**. S. 172 (1910).

[2]) *Battelli* und *Stern*, Oxydation der Zitronen-, Äpfel- und Fumarsäure durch tierische Gewebe. Biochem. Zeitschr. Bd. **31**. S. 479 (1911).

Die Untersuchungen an intakten und zerkleinerten Organen werden oft zweckmäßig durch Versuche mit Preßsäften, Organpulvern, Organextrakten und mehr weniger rein dargestellten Organfermenten ersetzt. Die Voraussetzung, daß Fermente, die sich in den Organen finden, auch im Stoffwechsel eine Funktion haben, ist vermutlich richtig, aber nicht bewiesen. Bedeutungsvoll, wenn auch nicht unmittelbar den normalen intermediären Stoffwechsel betreffend, ist die Erfahrung, daß nach parenteraler Zufuhr von Eiweißkörpern und zusammengesetzten Zuckerarten spezifische, den Abbau einleitende Fermente auftreten (*Weinland, Abderhalden* und Mitarbeiter). Die Technik der Fermentuntersuchungen ist ausführlich in Bd. III und V, S. 575 dargestellt.

Methodisches aus der Biochemie der Pflanzen.

Von Ernst G. Pringsheim, Halle a. S.

A. Sand- und Wasserkultur höherer Pflanzen.

a) Allgemeine Betrachtungen.

Die grüne Landpflanze nimmt aus der Luft nur die Kohlensäure auf. Alle anderen Stoffe stammen normalerweise aus dem Erdboden. Wasserstoff und Sauerstoff zum großen Teil aus dem Wasser, der Stickstoff und die Aschenbestandteile aus den Bodensalzen. Beide werden durch die Wurzeln aufgenommen.

Um zu prüfen, welche von den stets oder unter Umständen vorgefundenen Elementen zum normalen Gedeihen unbedingt erforderlich sind, müssen Methoden angewendet werden, die es gestatten, nur ganz bestimmte Stoffe zuzuführen, andere aber fortzulassen. Das natürliche Kultursubstrat, die Erde, ist ein aus verwitterten Gesteinen und zersetzten Pflanzen- und Tierstoffen zusammengesetztes Gemenge höchst komplizierter chemischer und physikalischer Struktur. An dieses ist die Pflanzenwurzel ihrer ganzen Lebensweise nach angepaßt. Für einigermaßen exakte Stoffwechselversuche ist natürliche Erde nicht brauchbar, weil es nicht gelingen kann, ihre Zusammensetzung den oben gestellten Forderungen entsprechend zu variieren. Man ist also stets auf Surrogate angewiesen, die alle von den normalen weit abweichende Verhältnisse bieten. Wollte man es selbst versuchen, aus den Bestandteilen des Kultur- oder „Humus"bodens, soweit sie bekannt sind, eine möglichst natürliche Erde zusammenzumischen, so würde man nur sehr schwer den, wie wir sehen werden, in chemischer Beziehung sehr strengen Forderungen des Versuches nachkommen können, und zudem doch nur unvollkommen die Bedingungen erreichen, wie sie die Natur bietet.

Man ist deshalb darauf angewiesen, entweder ein aus festen Teilchen zusammengesetztes lockeres Substrat zu benutzen, in dessen Poren die Lösung der entsprechenden Stoffe kapillar festgehalten wird, oder die Wurzeln in Wasser mit den nötigen Substanzen zu versorgen.

b) Sandkultur.

Einen festen Körper zu finden, der den zu stellenden Forderungen völlig entspricht, ist kaum möglich. Der betreffende Stoff soll nämlich

feinkörnig sein, um Wasser festhalten zu können und eine möglichst große Adsorptionsfläche zu bieten, und er muß chemisch absolut indifferent sein, damit er die Versuchsresultate nicht trübe. Auch soll er im angefeuchteten Zustande noch Luft enthalten.

Salm-Horstmar[1]) benutzte Kohle aus reinstem Kandiszucker, künstliche Kieselsäure, gepulverten Bergkrystall und geglühten Bachsand, andere Forscher Bimsstein, Schwefel, Gips und dergleichen. Von allen diesen Stoffen ist nur der Sand in genügender Menge zu beschaffen, um umfangreichere Versuche damit anzustellen. Außerdem haben die anderen Substrate alle den oder jenen Fehler.

Die Sandkultur dagegen ist besonders durch *Hellriegel* zu hoher Vollkommenheit ausgebildet worden. In seinen „Beiträgen zu den naturwissenschaftlichen Grundlagen des Ackerbaues“[2]) findet sich eine genaue Beschreibung seiner Methode, die hier kurz wiedergegeben werden soll. Die ausführliche Begründung der Vorschriften muß im Original nachgelesen werden.

Das Haupterfordernis ist ein möglichst reiner, feinkörniger Quarzsand. Er wird geglüht, geschlämmt, mit Säuren behandelt und ausgewaschen. Doch verlasse man sich auch dann nicht auf seine Reinheit, sondern analysiere ihn, besonders auf Alkalien und Eisen, falls es auf Ausschluß dieser Elemente ankommt.[3])

Auch die Kulturgefäße dürfen keine Nährstoffe abgeben. *Salm-Horstmar* benutzte deshalb Zinngefäße, die mit Wachs überzogen waren (a. a. O. S. 5). Man wird aber vorziehen, Glas zu verwenden, schon seiner Durchsichtigkeit wegen. Heute verfügt man über chemisch sehr indifferente Glassorten. Noch sicherer und dabei billiger sind aber gewöhnliche gläserne Blumentöpfe oder Akkumulatorengefäße, die innen mit einem indifferenten Überzug, wie Harz, Paraffin, vielleicht auch einem Lack zu überziehen sind (*Hellriegel* a. a. O. S. 767). Alle diese Überzüge müssen in fließendem Wasser lange ausgewaschen werden, wenn sie nicht die Wurzeln schädigen sollen.

Die Gefäße sollen nicht zu klein sein, also etwa 1—2 *l* fassen, je nach der Zahl und Größe der Pflanzen. Die für die Wurzeln sehr wichtige Durchlüftung findet dadurch statt, daß auf den Boden der Kulturgefäße eine Schicht weißer Quarzkieseln kommt, deren Zwischenräume durch ein Bodenloch oder eine senkrecht nach oben führende Glasröhre mit der Atmosphäre in Verbindung stehen. Auf die Steinchen kommt eine Lage gereinigte Watte und darüber der Sand.

Würde man den trockenen Sand im Kulturgefäße mit Wasser begießen, so würde dieses nur einzelne Regionen bis zur Sättigung durchnässen, andere aber trocken lassen. Man mischt also vorher die zu verwendende Nährsalzlösung zu dem Sande, und zwar soviel, daß er bröckelig

---

[1]) *Salm-Horstmar*, Versuche und Resultate über die Nahrung der Pflanzen. Braunschweig 1856. S. 762ff.

[2]) *Hellriegel*, Beiträge zu den naturwissenschaftlichen Grundlagen des Ackerbaues. Braunschweig 1883.

[3]) Der Sand kann von *Hugershoff*, Leipzig, Karolinenstraße 13, bezogen werden.

zusammenhält ohne zu klumpen oder zu zerfallen. Beim Einfüllen sucht man das lockere Gefüge des Erdbodens möglichst nachzuahmen, indem man den feuchten Sand in kleinen Portionen mit den Händen einbrockt.

Die Keimung der Samen läßt man auf Fließpapier vor sich gehen, das mit destilliertem Wasser getränkt ist. Am besten ist es, eine oder zwei Lagen Fließpapier auf eine umgelegte Glasschale zu legen und diese in einen Teller mit Wasser zu stellen, so daß das Papier ins Wasser taucht. Bei größeren Samen kommt noch eine Lage Papier darüber, so daß sie von beiden Seiten feucht gehalten werden. Über das Ganze wird eine Glasglocke gestülpt. Auch empfiehlt es sich, große Samen vor dem Auslegen zum Keimen in einer flachen Schicht wiederholt gewechselten destillierten Wassers 24 Stunden quellen zu lassen. Noch bequemer ist es vielleicht, als Keimbett feuchten Sand zu benutzen, in den die Samen halb eingedrückt werden.

Zur Aussaat in die Kulturgefäße benutze man möglichst gleich gekeimte Samen, deren Wurzeln eben hervortreten. Sie kommen in gleichem Abstande auf die geebnete Oberfläche des Sandes und werden dann mit einer Schicht Sand (die für diesen Zweck zurückblieb) bedeckt, und zwar wenige Millimeter bis 5 *cm* hoch, je nach ihrer Größe. Stets säe man mehr Samen aus als Pflanzen stehen bleiben sollen und treffe nach einiger Zeit eine neue Auswahl. Die im Wachstum zurückgebliebenen Exemplare werden dicht unterm Boden abgeschnitten. Will man später Analysen machen, so darf der Überschuß, besonders bei großen Samen, nicht zu bedeutend sein.

Das Gießen kann mit reinem destillierten Wasser geschehen. Dieses darf keine schädlichen Stoffe, wie etwa Kupferspuren aus Destillierblasen enthalten. Falls bestimmte N-Gaben vorgesehen sind, bedenke man auch die NH_3-Aufnahme aus der Luft. Besser wird es meist sein, nicht alle zuzuführenden Salze dem Sande von Anfang an zuzusetzen, sondern mindestens einen Teil zurückzuhalten und ganz allmählich mit dem Gießwasser zu geben. Gäbe man nämlich die ganze, für den vollen Entwicklungszyklus notwendige Salzmenge auf einmal, so könnte leicht eine schädliche Konzentration erreicht werden. Das natürliche Bodenwasser ist eine sehr verdünnte Lösung. Im Erdboden werden die lokal entnommenen Stoffe durch Diffusion aus der Nachbarschaft sowie durch Lösung schwerlöslicher oder an Colloiden adsorbierter Bestandteile ergänzt. In Sandkulturen aber soll die Konzentration $^1/_2$ %, bezogen auf die Gesamtsalze, nicht wesentlich übersteigen, da der Sand nur geringe Adsorptionskraft hat. Schließlich ist noch zu beachten, daß man die tägliche Wasserration vorsichtig in feinem Strahle etwa aus der Spritzflasche zufließen lasse, damit keine Zerstörung der Porosität und ungleiche Benetzung und Fortspülung des leicht schwemmbaren Sandes stattfinde. Bei sehr exakten Versuchen wird man die zu ergänzende Wassermenge mit der Wage feststellen, indem man so lange gießt, bis das Anfangsgewicht (oder — wegen der hinzugekommenen Pflanzenmasse — etwas mehr) erreicht ist.

Da es unmöglich ist, in bezug auf Licht und Wärme völlig gleichmäßige Bedingungen herzustellen, muß man dafür sorgen, daß wenigstens

alle Kulturgefäße einer Vergleichsserie gleiche Bedingungen erhalten. (Siehe weiter unten!)

c) Wasserkultur.

Die Bedingungen, die die Wurzel in Wasser vorfindet, weichen noch mehr von den natürlichen ab, als bei Sandkulturen. Zunächst ist die Durchlüftung schwieriger, dann ist die Wurzel im Wasser noch empfindlicher gegen allerlei schädliche Einflüsse, wie zu hohe Konzentration, Spuren giftiger Verunreinigungen u. dgl. Dafür kann man aber solche Schädigungen an der geringen Längenzunahme, knotigen Verdickungen oder Pilz- und Bakterienvegetation an den Wurzeln in dem durchsichtigen Medium ohne weiteres sehen. Dazu kommt noch die größere Exaktheit, die in chemischer Beziehung erreicht werden kann und die größere Bequemlichkeit. Denn die umständliche Bearbeitung des Sandes, die doch nie zur völligen Reinheit führt, fällt hier fort. Deshalb wird man immer dann, wenn die Versuchspflanze in einer Vorprobe ihre Eignung zur Wasserkultur gezeigt hat, diese vorziehen. Merkwürdigerweise scheint diese Fähigkeit mit den biologischen Eigentümlichkeiten der Pflanzen nichts zu tun zu haben. So geben z. B. Mais und Buchweizen besonders gute Resultate. Es ist aber doch die Frage, ob nicht Gewächse, die normalerweise in sehr feuchtem Boden oder selbst im Wasser wachsen, die Ausführung der Versuche noch erleichtern würden. Bei der nötigen Vorsicht vertragen aber zahlreiche Pflanzen das Wachsen in flüssigem Medium sehr gut.

Handelt es sich z. B. darum, die Kieselsäure auszuschließen, so ist überhaupt die Sandkultur ausgeschlossen.

Die Wasserkulturmethode verdankt ihre Ausbildung hauptsächlich *J. Sachs* und *W. Knop*.[1] Für das Material der Kulturgefäße und die Reinheit des Wassers gilt das oben Gesagte, nur in noch höherem Maße.

Die Keimpflänzchen müssen älter als bei Sandkulturen sein, bevor sie in die Kulturgefäße gebracht werden. Denn da wegen der Gefahr des Verfaulens nur ihre Wurzeln eintauchen dürfen, so müssen diese lang genug sein, um das Pflänzchen mit Wasser versehen zu können. Man läßt die Samen wiederum anquellen und dann entweder in Sägespänen oder in feuchter Luft keimen.

Die Sägespäne, die meist benutzt werden, geben immer Spuren von Stoffen ab und bedingen dadurch kleine Fehler. Sie sollen von weichem, harzfreiem Holz stammen und zur Verwendung als Keimbett mit soviel destilliertem Wasser versetzt und zwischen den Händen so verrieben werden, daß sie ganz locker in Blumentöpfe oder Holzkisten eingefüllt werden können.

[1] *W. Knop*, Über die Ernährung der Pflanzen durch wässerige Lösungen unter Ausschluß des Bodens. Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen. Bd. 2. 1860. S. 615, sowie Jahresbericht für Agrikulturchemie. 1861 ff. Vgl. auch *Nobbe*, Entwicklungsfähigkeit und Tragweite der Wasserkulturmethode. Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen. 1868. Bd. **10**. S. 1.

Die Samen bringt man in die Sägespäne; sie werden locker zugedeckt oder in ein vorgebohrtes Loch wenig eingedrückt. Für die Keimung in feuchter Luft, bei der eine Stoffaufnahme von Anfang an ganz vermieden wird, benutzt man etwa ausgespannten Tüll, auf den die angequollenen Samen kommen. Sie werden mit einer Glocke bedeckt und von Zeit zu Zeit gelüftet und nach Bedarf bespritzt.

Sind die Wurzeln 3—10 *cm* lang, so kommen die Keimlinge in die Kulturgefäße. Hier muß nun für eine besondere Befestigung gesorgt werden, die insofern Schwierigkeiten macht, als das eigentliche Befestigungsorgan, die Wurzel dazu nicht benutzt werden kann. Aus den Getreidekörnern treten nach unten nur Wurzelorgane aus. Sie können daher dicht über der Wasseroberfläche befestigt werden. Bei den dikotylen Keimlingen muß darauf geachtet werden, ob natürlicherweise die Kotyledonen im Boden bleiben (Erbsen, Feuerbohnen, Pferdebohnen) oder durch Streckung des zwischen ihnen und der Wurzel befindlichen Stengelstückes (des Hypokotyls) sich erheben (Kürbis, Buchweizen, Buschbohne, Sonnenrose). Danach hat die Befestigung zu geschehen. Denn niemals darf ein Stengelorgan ins Wasser tauchen, sonst würde es faulen. Da das hypokotyle Glied sich noch längere Zeit streckt, muß man wiederholt nachsehen und die Befestigung entsprechend korrigieren.[1] Die obersten Teile der Wurzeln brauchen nicht ganz ins Wasser zu tauchen.

Die Kulturgefäße sind entweder weithalsige Flaschen oder besser oben offene Zylinder. Im ersteren Falle verwendet man einen Kork, der eine weite Durchbohrung zur Aufnahme der Pflanze erhält. Außerdem wird radial von dem Loche aus ein Streifen Kork herausgeschnitten, der das seitliche Einführen des Stengels erlaubt und nachher wieder eingefügt wird. Der Kork wird mit geschmolzenem Paraffin getränkt, um das Wachstum von Schimmelpilzen zu verhindern. Zylinder erhalten einen Deckel. Er kann aus Glas sein und bekommt dann in der Mitte ein größeres Loch zur Aufnahme des Korkes und daneben ein kleineres, durch das ein Holzstab zur späteren Befestigung der Pflanze gesteckt wird. Auch kann man lackierte Zinkblechdeckel verwenden, die mit übergreifendem Rand oder drei heruntergebogenen Zungen versehen sind, um seitliches Rutschen zu verhüten. Besser sind die von *Pfeffer*[2]) empfohlenen Porzellandeckel mit einem kurzen Tubus in der Mitte zur Aufnahme des durchbohrten paraffinierten Korkes, einem Schlitz zum Einführen der Pflanze und einem kleineren Loche für den Stab, respektive ein Glasrohr, das zur Durchlüftung dienen kann. Der seitliche Schlitz wird mit einem paraffinierten Korkstreifen geschlossen. Solche Wasserkulturgefäße liefern *Greiner* und *Friedrichs*, Stützerbach, Thüringen (Fig. 271). Holzdeckel sind nicht zu empfehlen, weil sie sich ziehen.

[1]) *J. Sachs*, Bericht über die physiologische Tätigkeit an der Versuchsstation in Tharandt. Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen. Bd. 2. 1860. S. 23.

[2]) *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Bd. 1. Leipzig 1897. S. [illegible]

Die jungen Keimlinge werden in der Durchbohrung des Korkes in Einzahl mit Watte befestigt, und zwar so, daß die sich nicht erhebenden Reservestoffbehälter, wie z. B. das Endosperm beim Mais oder die Kotyledonen der Bohne, sich in feuchter Luft befinden ohne ins Wasser zu tauchen. Bei Pflanzen mit sich streckendem Hypokotyl wird dieses mit Watte in der Öffnung befestigt.

Fig. 271.



Wasserkultur von Buchweizen. *A* ohne Kalium, *B* in vollständiger Nährlösung, *C* ohne Eisen. (Aus *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. I.)

Die Kulturgefäße müssen verdunkelt werden, damit ein Wachstum von Algen verhindert werde. Dazu eignen sich am besten Zinkblechstücke, die zu einem Zylinder gebogen sind oder heller Flanell. Dunkle Stoffe oder schwarzes Papier sollen nicht verwendet werden, weil sonst eine zu große Erwärmung des Wassers eintreten könnte, die überhaupt zu vermeiden ist. Doch ist schwarzes Glanzpapier, mit der weißen Seite nach auswärts genommen, recht günstig.

Das verdunstete Wasser ist durch destilliertes zu ersetzen. Die Nährlösung ist manchmal aufzurühren. Das geschieht am besten unter gleichzeitiger Durchlüftung. Ein bis auf den Boden reichendes Glasrohr wird mit einer Wasserstrahldruckpumpe oder einer Druckflasche verbunden und täglich einmal ein paar Minuten ein Luftstrom durch die Nährlösung geschickt.

Auch hier soll, wie bei der Sandkultur, nicht die ganze Nährsalzmenge auf einmal gegeben werden. Man erneuert vielmehr die ganze Lösung wiederholt. Das geschieht am besten so, daß man ein frisches Gefäß

bereit stellt und die Pflanze mit dem Deckel hinüber hebt. Bei kleineren und mittleren Pflanzen kommt man mit 2—5 *l* Flüssigkeit aus. Besser sind große Gefäße von 10—20 *l* Inhalt.[1] Man kann dann mit sehr verdünnten Lösungen von etwa 0·1—0·2% Gesamtgehalt an Salzen arbeiten. Höhere Konzentrationen als etwa 0·3 bis höchstens 0·5% werden in Wasserkultur nicht vertragen.

d) Regeln, die für Wasser- und Sandkulturen gelten.

Die Einzelheiten in der Zusammensetzung der Nährsalzmischungen bleiben dem jeweiligen Experimentator vorbehalten, der mit ihrer Hilfe durch mannigfache Variation gewisse Fragen zu lösen unternimmt. Einige allgemeine Regeln, die man nicht außer Acht lassen darf, können aber doch aus den bisherigen Erfahrungen gezogen werden.

Die Reaktion der Lösung soll schwach sauer sein, was z. B. durch Verwendung von Monophosphaten erreicht wird. Sonst dürfen auch einige Tropfen verdünnter Phosphorsäure zugesetzt werden. Es ist zu bedenken, daß ein an sich neutrales Salz durch Verbrauch der Säure oder der Base „physiologisch alkalisch oder sauer" wirken kann. Stärkere H- oder OH-Ionenkonzentration ist aber durchaus zu vermeiden. Durch gegenseitige Kompensation der einzelnen Nährsalze, also solcher, deren Base, und solcher, deren Säure vorzugsweise aufgebraucht wird, können stärkere Abweichungen von der günstigen Reaktion vermieden werden.

Sehr schwer lösliche Ausfällungen sollen in der kombinierten Lösung nicht entstehen. Einigermaßen in kohlensäurehaltigem Wasser lösliche Niederschläge werden besonders bei häufigem Aufrühren von der Pflanze allmählich ausgenutzt. In Sandkulturen schaden sie erst recht nichts. Zu solchen Niederschlägen wird das gleichzeitige Zugegensein von Ca-, Mg- und Fe-Salzen mit Phosphaten führen. Sie lassen sich schwer ganz vermeiden. Durch Verwendung geringer Mengen von Mg-Salz und sauerer Phosphate sind sie aber auf ein Minimum zu beschränken. Auch kann man nach *Sachs*[2]) die miteinander ausfallenden Stoffe in getrennten Lösungen geben und die Pflanzen periodisch in der einen und der anderen kultivieren. *Knop*[3]) hat sogar jedes Salz für sich gelöst und die Pflanzen aus einem Kulturgefäß der Reihe nach in die anderen übertragen. Doch wird man meist vorziehen, gemischte Lösungen zu verwenden, was bei Sandkulturen unvermeidlich ist.

Da in den Salzen immer zwei Nährelemente im Anion und Kation enthalten sind, muß beim Fortlassen des einen ein entsprechendes anderes Salz gegeben werden. Dabei ist aber zu bedenken, daß die einzelnen Kom-

---

[1]) *J. Wortmann*, Notiz über Wasserkulturen. Botan. Ztg. 1892. S. 643.

[2]) *Sachs*, Bericht über die physiologische Tätigkeit an der Versuchsstation in Tharandt. Die landwirtschaftlichen Versuchsstationen. 1860. Bd. 2. S. 22 u. 224.

[3]) *Knop*, Über die Ernährung der Pflanze durch wässerige Lösungen bei Ausschluß des Bodens. Ebenda. S. 273.

ponenten eines unschädlichen Gemisches einzeln giftig wirken können, so z. B. Kalziumsalze ohne Magnesiumsalze u. dgl. Man sieht, daß nur bei Benutzung aller Erfahrungen ein günstiges Resultat zu erzielen ist.

Viel Sorgfalt ist bei allen vergleichenden Kulturversuchen auf die Qualität und vor allem die Gleichmäßigkeit des Samenmateriales zu legen. Denn es ist kaum möglich, so viele Einzelkulturen anzulegen, daß alle individuellen Differenzen sich ausgleichen. Deshalb tut man gut, nach vorsichtiger Auswahl mit Hilfe des Augenscheines und der Wage noch die Keimung außerhalb der Kulturgefäße so weit vor sich gehen zu lassen, daß man ein gewisses Urteil über die individuellen Differenzen gewinnt. *Hellriegel* berechnet (a. a. O., S. 773), daß man hundertmal so viel Samen zur Auswahl haben müsse als nachher für die eigentlichen Versuche Verwendung finden sollen.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die im Samen vorhandenen Reservestoffe stets Fehler bedingen, die um so kleiner sind, je mehr das Erntegewicht das Samengewicht übertrifft. Man bevorzuge also kleine Samen von Pflanzen mit reichlicher Stoffproduktion.

Will man ein möglichst üppiges Wachstum bekommen und die Pflanzen bis zur Samenreife kultivieren, so ist auf geeignete Wärme- und Lichtverhältnisse zu achten. Die Jahreszeit spielt eine große Rolle. Man wähle sie möglichst den natürlichen Verhältnissen entsprechend. Für Kulturpflanzen halte man sich mit der Zeit der Aussaat an die landwirtschaftliche oder gärtnerische Praxis. Im Winter wird auch bei Verwendung eines geheizten Gewächshauses die Produktion organischer Substanz aus Mangel an Licht stets sehr gering sein.

Ist es irgend angängig, so stelle man die Kulturgefäße ins Freie, wo sie von allen Seiten gleichmäßiges und ungeschwächtes Licht haben. Bei Regen müssen sie aber unter Dach gebracht werden. Für Versuche im großen kommen die Kulturen auf Wagen, die auf Schienen in ein Schutzgewächshaus geschoben werden können. *Hellriegel* hat eine solche Anlage mit verschiedenen Nebeneinrichtungen ausführlich beschrieben.[1]) Gewöhnlich wird man sich damit begnügen müssen, die Gefäße auf ein Brett vor einem Südfenster zu stellen. Das ist immer noch besser als ein geschlossenes Gewächshaus.

Da das Licht, selbst im Freien, niemals alle Pflanzen ganz gleichmäßig treffen wird, so verhüte man gegenseitige, ungleiche Beschattung von Vergleichskulturen durch wiederholtes Umstellen der Gefäße.

Im Freien ist für Bestäubung zur Erzielung reichlichen Fruchtansatzes nicht besonders zu sorgen, da Wind oder Insekten freien Zutritt haben. Doch überzeuge man sich zur Blütezeit jedenfalls sorgfältig, ob auch Befruchtung stattfindet, und helfe eventuell nach.

Will man die Gesamternte analysieren, so breche man den Versuch ab, bevor größere Teile der Pflanzen abgestorben sind. Der Zeitpunkt muß freilich

[1]) *Hellriegel,* Grundlagen des Ackerbaues. Braunschweig 1883. S. 483 ff.

stets individuellem Ermessen überlassen bleiben. Die Früchte resp. Samen wird man im allgemeinen gesondert ernten. Falls Analysen nicht ausgeführt werden können, so begnüge man sich doch nicht mit dem bloßen Augenschein, sondern bestimme mindestens das Trockengewicht. Manchmal ist scheinbar ganz gutes Wachstum zu verzeichnen, das aber allein durch Wasseraufnahme zustande gekommen ist. Das Trockengewicht beträgt dann bei der Ernte nicht mehr oder selbst weniger als das der ausgelegten Samen. Vergleichskulturen in Erde sollten immer angesetzt und unter den gleichen Bedingungen gehalten werden.

B. Methoden zum Studium der Kohlensäureassimilation chlorophyllhaltiger Pflanzen.

Bei der Assimilation chlorophyllhaltiger Pflanzenteile am Lichte wird Kohlensäure gespalten, wobei Sauerstoff frei wird und organische Stoffe gebildet werden. Demgemäß kann man drei Gruppen von Methoden unterscheiden, die dazu dienen, eine Kohlensäureassimilation nachzuweisen. Man prüft:

a) die Entstehung von Sauerstoff;
b) das Verschwinden der Kohlensäure;
c) die Bildung organischer Stoffe.

a) Nachweis des entstehenden Sauerstoffes.

Der Nachweis des entstehenden Sauerstoffes stellt die am häufigsten benutzte Methode zur Orientierung über stattgehabte Kohlensäureassimilation dar. Natürlich muß hierbei, wie bei allen anzuführenden Methoden berücksichtigt werden, daß stets gleichzeitig durch die Atmung umgekehrt Kohlehydrate verschwinden, Sauerstoff verbraucht und Kohlensäure frei gemacht wird. Wirklich trennen lassen sich die beiden entgegengesetzten Prozesse bisher nicht. Man kann jedoch durch Parallelversuche im Dunkeln die Größe der Atmung angenähert bestimmen und unter der Voraussetzung, daß sie am Lichte in derselben Stärke weiter geht, die Größe des Fehlers berechnen. Auch läßt sich durch Wahl einer zweckmäßig nicht zu hohen Temperatur das Verhältnis der Atmung zur Assimilation verkleinern; denn mit der Temperatur steigt die erstere in viel höherem Maße als die letztere.[1])

Zum qualitativen Nachweis von Sauerstoff sind sehr viele chemische Methoden möglich, von denen einige, bisher hauptsächlich angewandte besprochen werden sollen:

Boussingault[2]) führte hierfür den weißen Phosphor ein. Als Erkennungszeichen für das Vorhandensein von Sauerstoff dient:

[1]) *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Bd. 1. Leipzig 1897. S. 321.
[2]) *Boussingault*, Sur les fonctions des feuilles. Ann. d. sciences natur. 1868. V. sér. T. 10. p. 331.

1. das Leuchten im Dunkeln.
2. das Auftreten von Nebeln,
3. die Verminderung des Gasvolumens.

Der Phosphor kann mit der Pflanze in einem Gefäße eingeschlossen werden, da die entstehende unterphosphorige und phosphorige Säure nach *Boussingault* diese nicht schädigt. Das kann allerdings wohl nur für kurze Zeit gelten, da diese Säuren sich im Zellsaft lösen und stark reduzierend wirken müssen. Bequem für den Gebrauch ist die Möglichkeit, durch den Phosphor selbst im Dunkeln den Sauerstoff im Versuchsgefäß fortnehmen zu lassen und dann nach einer assimilatorisch wirksamen Belichtung schon geringe Mengen von O an der Entstehung von Nebeln oder am Leuchten nachweisen zu können.

Im allgemeinen wird man jedoch vorziehen, ungiftige, leicht oxydable und womöglich Farbenumschläge gebende Stoffe zu verwenden.

Beijerinck[1]) benutzt im Anschluß an *Regnard* Indigweiß. Dieses wird hergestellt durch Reduktion von neutralem, indigschwefelsaurem Natrium mit saurem Sulfit in geringem Überschuß. Wird nur gerade bis zur Entfärbung reduziert, so findet am Lichte eine Blaufärbung auch ohne hinzugekommenen Sauerstoff statt.

Nach *L.* und *K. Linsbauer*[2]) soll man eine konzentrierte Lösung von saurem, schwefligsaurem Natrium 5 Minuten mit Zinkstaub schütteln, mit Kalkmilch neutralisieren, absetzen lassen und mit der klaren Flüssigkeit eine tiefblaue Lösung von Indigokarmin durch tropfenweises Zusetzen entfärben. In der gelblichen Flüssigkeit, die eine Stopfenflasche ganz füllt, bewirkt eine Wasserpflanze (auch Moos oder Fadenalgen) am Lichte das Auftreten blauer Schlieren, die unmittelbar die Sauerstoffproduktion demonstrieren. Der Kalkmilchzusatz wird jedenfalls sehr vorsichtig zu geschehen haben, weil sonst keine freie Kohlensäure in der Lösung verbleibt. In alkalischen Flüssigkeiten findet keine Kohlensäureassimilation statt.

Andere Rezepte für Sauerstoffindikatoren mit Hilfe von Indigo findet man im III. Bande bei den Methoden zur Kultur anaerober Bakterien (Seite 1241 ff.).

Neben der Indigomethode verwendet *Beijerinck* (a. a. O.) in seinen Versuchen mit mikroskopischen Algen deren Wachstum selbst als Reagens auf Assimilation. Hierfür sind die in Bd. III. 1, S. 1204 ff. beschriebenen Methoden der Bakteriologie maßgebend. Eine Gelatine- oder Agargallerte mit den nötigen Nährsalzen enthält fein verteilte Algen. Diese vermehren sich nur in assimilatorisch wirksamem Lichte, und zwar mit scharfen Grenzen. Die belichteten Stellen werden allmählich tief grün oder braun, je nachdem grüne Algen oder Diatomeen verwendet werden.

Das Resultat, daß das Wachstum auf die belichteten Stellen beschränkt bleibt, hat seine Ursache einmal in der mangelhaften Ernährung

[1]) *Beijerinck*, Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Botanische Zeitung. 48. Jahrg. 1890. S. 741 ff.

[2]) *L.* und *K. Linsbauer*, Vorschule der Pflanzenphysiologie. Wien 1906.

im Dunkeln und dann in dem Fehlen des Sauerstoffes. Gute Resultate sind aber nur mit solchen Algen zu erzielen, die im Dunkeln gar nicht zu wachsen vermögen. Manchen genügen die organischen Stoffe des Agars oder der Gelatine, um eine Vermehrung auch ohne Licht zu ermöglichen. Immer wird es sich empfehlen, die algenhaltige Gallerte in dünner Schicht zwischen Glasplatten einzuschließen, um Sauerstoffzufuhr von außen zu vermeiden und gleichmäßige Belichtung zu ermöglichen.

In geeigneter Ausführung können solche Versuche sogar quantitative Resultate ergeben.[1] Durch Zählung der von einer Zelle ausgegangenen Kolonien bekommt man nämlich ein relatives Maß für die Stärke der Assimilation bei der gegebenen Helligkeit oder Lichtfarbe.

Ferner hat *Beijerinck* noch eine Methode des Sauerstoffnachweises in die Pflanzenphysiologie eingeführt (a. a. O. S. 744), die wegen ihrer großen Empfindlichkeit ganz besonders brauchbar ist. Er weist nämlich O_2 mit Hilfe von L e u c h t b a k t e r i e n nach, die bei Sauerstoffmangel ihre Lichtproduktion einstellen, bei Sauerstoffzutritt aber momentan aufleuchten. Am besten werden für den Zweck dicht gesähte Plattenkulturen von Leuchtbakterien in Meerwasseragar verwendet. Reinkulturen solcher sind von *Král*[2]) oder *Hugershoff*[3]) zu beziehen. Geeignet ist besonders Micrococcus phosphoreus Cohn. Die zu prüfenden Objekte können, falls sie aus dem Meere stammen (Tange, Rotalgen), zusammen mit den Leuchtbakterien in den Agar eingeschmolzen werden, der sich in einem parallelwandigen engen Gefäße befindet. Sonst müssen Pflanzen und Bakterienkulturen in einem möglichst kleinen Luftvolumen zusammen eingeschlossen werden. Durch die Atmungstätigkeit der Organismen verschwindet im Dunkeln der Sauerstoff, die Leuchtbakterien werden lichtlos. Nach kurzer Beleuchtung aber senden sie im Dunkeln wieder Licht aus. *Molisch*[4]) prüfte das Assimilationsvermögen zerriebener grüner Pflanzenteile, indem er den Brei mit einer leuchtbakterienhaltigen Bouillon vermischte. Diese enthielt auf 1 l verdünnten Rindfleischsaftes 10 g Pepton, 10 g Glyzerin und 30 g Kochsalz. Die Flüssigkeit wurde in schmale Zylinder mit eingeriebenem Stopfen gefüllt und unter Vermeidung von Luftblasen eingeschlossen.

Ähnlich wie mit reduziertem Indigo läßt sich auch mit B l u t f a r b s t o f f arbeiten. Diese Methode hat *Hoppe-Seyler*[5]) erdacht. Nach ihm schließt man etwa Elodeazweige mit verdünntem faulenden Blut in einer Glasröhre ein. Es zeigt sich zunächst, spektroskopisch betrachtet, der Absorptionsstreifen des Hämoglobins. Am Lichte wird das Hämoglobin durch den

[1]) *Meinhold*, Beiträge zur Physiologie der Diatomeen. *Cohns* Beitr. zur Biologie d. Pflanzen. 1911.

[2]) *Krals* Bakter. Museum. Prof. *Kraus* und Doz. *Pribram*, Wien IX., Zimmermanngasse 3.

[3]) *Hugershoff*, Leipzig, Karolinenstr. 13.

[4]) Über Kohlensäure-Assimilationsversuche mittels der Leuchtbakterienmethode. Botan. Zeitung. 1904. Bd. 62. S. 4.

[5]) *Hoppe-Seyler*, Einfacher Versuch zur Demonstration der Sauerstoffausscheidung durch Pflanzen im Sonnenlichte. Zeitschr. für physiolog. Chemie. 1879. Bd. 2. S. 325.

bei der Atmung entstehenden Sauerstoff oxydiert, und es erscheinen die beiden Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins, während der Absorptionsstreifen des Hämoglobins verschwindet. Im Dunkeln wirkt die Atmung der Pflanze mit den reduzierenden Fäulnisprozessen zusammen, den alten Zustand wieder herzustellen. Der Wechsel kann während mehrerer Tage beliebig oft bewirkt werden.

Dasselbe Reagens hat später *Engelmann* auch für mikroskopische Beobachtung verwendet.[1] Er schließt einen Faden von Spirogyra oder dergleichen unter dem Deckglase mit einem Tropfen wenig oder gar nicht verdünnten defibrinierten Rinderblutes ein. Das Blut wird vorher durch einen Wasserstoff- oder Kohlensäure-Strom reduziert, so daß es venöse Farbe annimmt. Bald wird das Blut in der Nähe des beleuchteten Fadens bis auf $^1/_2$ - 2 *mm* hell arteriell rot. Die Grenze zum venösen Blute ist ganz scharf. Im Dunkeln kehrt die alte Farbe schnell zurück, und zwar zuerst wieder in der Nähe des Fadens. Wird ein Spektralokular zu Hilfe genommen, so beobachtet man schon nach 10—20 Sekunden das Auftreten der Oxyhämoglobinlinien im Lichte. Wird der grüne Faden mit einem Mikrospektrum beleuchtet, so treten Erscheinungen auf, ähnlich den unten bei der Bakterienmethode beschriebenen. So viel wie diese leistet die Hämoglobinmethode jedoch nicht.

Ferner eignet sich das Pyrogallol zum Nachweis von Sauerstoff. Man kann die Braunfärbung oder die Volumverminderung nach Einführung geeigneter Lösungen von Kalilauge und Pyrogallussäure als Zeichen stattgehabter Assimilation benutzen. Wird z. B. aus einem bis zum Halse gefüllten Kolben mit Wasser durch Kochen der Sauerstoff vertrieben, dann Öl aufgegossen und erkalten gelassen, so kann man nachher ein paar Kohlensäureblasen oder etwas $KHCO_3$ und ein Stück einer Wasserpflanze einführen. Am Lichte bildet sich sehr rasch Sauerstoff, der durch Zugießen von Kalilauge und Pyrogallussäurelösung an der Dunkelbraunfärbung zu erkennen ist. Ein im Dunkeln aufbewahrter gleich behandelter Kolben färbt sich nur gelblich.[2]

Durch dasselbe Reagens läßt sich in einem durch Quecksilber abgesperrten Luftvolumen der Sauerstoff quantitativ absorbieren und so eudiometrisch bestimmen.

Die hierfür in Betracht kommenden Methoden sind dieselben, die in Bd. III, S. 490 ff. bei der Atmung besprochen worden sind. Auch wären die auf S. 622 ff. desselben Bandes beschriebenen gasanalytischen Methoden größtenteils für unsere Zwecke brauchbar. Besondere Anpassungen an die Zwecke des Studiums der Assimilation sind kaum zu erwähnen.

Eine besonders große Rolle haben aber bei den Untersuchungen über Kohlensäureassimilation zwei weitere Methoden gespielt, nämlich die „Blasenzählmethode" und die *Engelmann*sche „Bakterienmethode", von denen

[1]) *Engelmann*, Über Blutfarbstoff als Mittel zur Untersuchung des Gaswechsels chromophyllhaltiger Pflanzen im Licht und im Dunkeln. Biologisches Zentralblatt. 1888. Bd. 8, S. 33.

[2]) Nach Versuchen von *Angelstein* im Halleschen Botan. Institut.

die erstere sich durch bequeme Anwendbarkeit und die zweite durch ihre Feinheit auszeichnet.

Die Blasenzählmethode beruht darauf, daß abgeschnittene Blätter oder Zweige von Wasserpflanzen in kohlensäurehaltigem Wasser am Lichte aus der Schnittfläche Blasen ausscheiden. Da nämlich bei der Assimilation aus der gelösten Kohlensäure der schwerer lösliche Sauerstoff entsteht, muß dieser in Gasform auftreten, falls das Wasser nicht ganz sauerstofffrei ist.

Sachs[1]) zeigte, daß die Zahl der in der Zeiteinheit abgeschiedenen Gasblasen ein Maß für die relative Assimilationsstärke unter verschiedenen Umständen abgeben kann. Bei einer bestimmten Konfiguration der Schnittfläche entweicht das Gas aus den Interzellularen geeigneter Pflanzen, wie Elodea, Potamogeton, Ceratophyllum, Hydrilla etc. in Form gleichmäßig großer Blasen, die langsam genug aufeinander folgen, um gezählt werden zu können. Falls die Blasen zunächst zu klein und deshalb zu häufig sind, so muß durch Erneuerung der Schnittfläche eine Verbesserung solange versucht werden, bis die Pflanze den Anforderungen entspricht.

Vergleichsversuche sind mit einer und derselben Pflanze anzustellen, da zwei ganz gleiche Stücke nicht zu bekommen sind. Auch darf der Versuchszweig bei Änderung der Bedingungen seine Lage zum Lichte nicht wechseln, weil sonst die Menge des aufgefangenen Lichtes sich ändern würde. Man befestigt am besten die Pflanzenstücke mit dem Schnittende nach oben an einem Glasstabe. Die Schnittfläche darf nicht zu tief versenkt sein und muß einen konstanten Abstand vom Wasserspiegel haben, da der Druck des Wassers der Blasenabscheidung entgegenwirkt. Bei Berücksichtigung dieser Fehlerquellen wird man an einem und demselben Pflanzenstengel nahezu konstante Blasenabscheidung durch Stunden beobachten können, vorausgesetzt, daß die Temperatur, die Beleuchtung und die Kohlensäuretension im Wasser gleichmäßig bleiben.

Sachs (a. a. O., S. 363/64) hat schon die der Methode eigentümlichen Vorzüge klar erkannt. Gegenüber einer Volumbestimmung des ausgeschiedenen Gases z. B. ist die geringere Versuchsdauer der Blasenzählmethode von Vorteil. Denn so geringe Volumina, wie sie sich an der Zahl der Blasen erkennen lassen, sind volumetrisch kaum zu bestimmen.

Die kurze Versuchsdauer ermöglicht: 1. die Anstellung zahlreicher Versuche; 2. die Verwendung des natürlichen Tageslichtes, das für kurze Zeit konstant gesetzt werden kann; 3. die schnelle Erledigung der Versuche, ohne daß in der Zeit eine Veränderung der Pflanze zu befürchten wäre und damit 4. einen häufigen Wechsel von zu vergleichenden und sich gegenseitig kontrollierenden Versuchsbedingungen.

Wo es die Fragestellung erlaubt, wird man freilich nicht das wechselnde Sonnenlicht, sondern das konstantere künstliche verwenden. Geeignet ist z. B. eine Auerlampe. Um hellere Beleuchtung zu erzielen, kann

[1]) *Sachs*, Über die Auflösung und Wiederbildung des Amylums in den Chlorophyllkörnern bei wechselnder Beleuchtung. Botan. Ztg. 1864. Bd. 22. S. 363 ff.

man einen wassergefüllten großen Glaszylinder als „Zylinderlinse" benutzen und in den Brennstreifen die Pflanzen bringen. Man erreicht so gleichzeitig, daß die ultraroten Strahlen absorbiert werden, die eine der Assimilation verderbliche und die Resultate fälschende Erwärmung hervorrufen könnten.

Die Zählung der Blasen geschieht am bequemsten mit Hilfe einer Sekundenarretieruhr oder der akustischen Signale eines Metronoms. Doch kann man auch mit der gewöhnlichen Taschenuhr arbeiten, die man neben der Pflanze aufhängt, so daß beide mit einem Blicke zu übersehen sind.

Um Konstanz der Kohlensäuretension zu erreichen, hat *Sachs* (a. a. O. S. 364) Kohlensäure eingeleitet. Dasselbe haben die meisten späteren Experimentatoren getan. Eine Übersättigung mit Gasen ist aber, wie wir jetzt wissen, zu vermeiden, weil sie eine von der Assimilation unabhängige Blasenabscheidung bewirken kann.[1]) Man läßt daher besser das zu verwendende Wasser mindestens einen Tag im Versuchsraume stehen und sorgt dafür, daß es sich während des Versuches nicht wesentlich erwärme. Der Erschöpfung an Kohlensäure, die gar nicht so schnell vor sich geht, beugt man besser durch größere Wassermenge und eventuell durch Wechsel des Wassers vor. Jedenfalls prüfe man, ob unter den gewählten Bedingungen die Blasenabscheidung im Dunkeln bald aufhört. Ist das nicht der Fall, so können die Versuche nicht als korrekt gelten.

Destilliertes Wasser gibt sehr geringe Blasenzahlen, selbst wenn es an Kohlensäure angereichert ist. Besser ist Leitungs- oder Brunnenwasser, deren Gehalt an Bikarbonaten einen größeren Vorrat an verarbeitbarer Kohlensäure gewährleistet.[2])

Pfeffer[3]) weist darauf hin, daß das abgeschiedene Gas niemals reiner Sauerstoff sei. Ihm ist durch Diffusion stets Stickstoff und Kohlensäure beigemischt, und zwar um so mehr, je geringer die Assimilationstätigkeit ist. Dieser Umstand beeinträchtigt nach *Pfeffer* die Genauigkeit der Resultate, indem die Differenzen in der Assimilation, die unter günstigen und ungünstigen Bedingungen beobachtet sind, geringer erscheinen, als sie wirklich sind (a. a. O., S. 51, 52). Die Beimengung von Stickstoff und Kohlensäure kann selbst so weit gehen, daß der Sauerstoff nur den vierten Teil des Gasvolumens ausmacht, wie das *Angelstein*[4]) im Winter fand. Nach *Reinke*[5]) ist dagegen die Blasenzahl allein von dem Überdrucke in den Interzellularen abhängig, so daß

[1]) *H. Devaux*, Du mécanisme des échanges gazeux chez les plantes aquatiques submergées. Ann. d. sciences nat. Bot. Sér. VII. T. 9. 1889. p. 35 und *Kniep* u. *Minder*, Über den Einfluß verschiedenfarbigen Lichtes auf die Kohlensäureassimilation. Zeitschrift f. Botanik. Bd. 1. 1909. S. 636.

[2]) *Angelstein*, Untersuchungen über die Assimilation submerser Wasserpflanzen. *Cohns* Beiträge zur Biologie d. Pflanzen. 1910.

[3]) *Pfeffer*, Die Wirkung farbigen Lichtes auf die Zersetzung der Kohlensäure in Pflanzen. Arbeiten aus dem botan. Inst. in Würzburg. Bd. 1. 1871. S. 1.

[4]) *Angelstein*, a. a. O. S. 116.

[5]) *Reinke*, Untersuchungen über die Einwirkung des Lichtes auf die Sauerstoffausscheidung der Pflanzen. Botan. Ztg. 1884. Bd. 42. S. 25 und 26.

die Diffusion keinesfalls die Gasabscheidung vermehrt. Bei geringer Assimilation wäre danach im Gegenteil die Blasenzahl geringer, weil durch Diffusion Sauerstoff verloren geht. Experimentell scheint die Frage nicht bearbeitet zu sein.

Wenn aber auch die Blasenzählmethode in ihrem Werte durch diese Fehlerquellen etwas beeinträchtigt ist, so sind doch die Resultate bei Berücksichtigung des Gesagten durchaus brauchbar, jedenfalls mindestens ebensogut wie die durch Gasanalyse gewonnenen, die teilweise denselben Fehlern unterliegen.

Die Methode ist besonders zu verwenden, wenn es sich um die Wirksamkeit verschiedenfarbigen Lichtes, um die Brauchbarkeit irgendwelcher Lösungen, um den Einfluß von Temperatur und Helligkeit u. dgl. handelt. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß man nach dem Wechsel der Versuchsbedingungen einige Zeit warten muß, bis Konstanz der Blasenzahl eingetreten ist. Wird z. B. die Helligkeit herabgesetzt, so wird erst noch ein paar Minuten mehr Gas abgeschieden, als es den neuen Bedingungen entspricht. Sollen die Lösungen gewechselt werden, so muß die Pflanze besonders gut befestigt sein, etwa mit Bast an einem Glasstab, der unverrückbar an einem Stativ angeklammert ist. Das Wassergefäß steht auf einem Holzklotz. Beim Wechseln wird dieser fortgezogen, so daß das Gefäß mit einem anderen vertauscht werden kann, ohne daß die Stellung der Pflanze verändert wird. Das Gleichgewicht stellt sich auch hier erst nach einigen Minuten ein, wenn die in der Pflanze enthaltene Flüssigkeit sich mit der Außenlösung ausgeglichen hat.

Schließlich sei noch betont, daß nur in den Frühlings- und Sommermonaten das Material in brauchbarem Zustande ist. Außerhalb dieser Zeit liefern auch gesund aussehende Pflanzen bei günstigem Lichte keine guten Resultate.

Um den Fehlern zu entgehen, die durch wechselnde Blasengröße entstehen könnten, hat *Kohl*[1]) eine Methode ersonnen, die es gestattet, das Volumen des in Blasenform abgeschiedenen Gases mikrometrisch zu bestimmen. Er benutzt ein Präparat, das aus einem Elodeablatte und einem kleinen, mit dem Rasiermesser herausgeschnittenen Stengelfragmente besteht. Das Objekt wird auf den Boden eines kleinen flachen Schälchens durch Auflegen eines Glasplättchens unter Wasser festgehalten. Die am Lichte aus den Interzellularen hervortretende Gasmasse nimmt annähernd Kugelgestalt an, so daß aus dem mikrometrisch festgestellten Durchmesser das Volumen leicht zu berechnen ist. Durch diese Methode — die sich zudem sehr zweckmäßig eines in der Hauptsache flachen, dünnen Assimilationsorganes bedient — sind gewiß manche Vorteile gegeben, die aber, wie es scheint, noch nicht zu irgendwelcher Anwendung, außer durch den Autor, geführt haben.

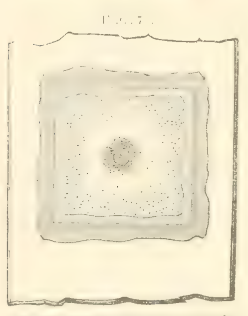
[1]) *Kohl*, Die assimilatorische Energie der blauen und violetten Strahlen des Spektrums. Berichte d. deutsch. botan. Gesellsch. Bd. 15, 1897, S. 120ff.

Die *Engelmann*sche Bakterienmethode[1]) dient dem Studium verschiedener Faktoren bei der Kohlensäurespaltung im Lichte, die auf andere Weise schwer anzugreifen sind. Besonders groß ist die Feinheit der Methode. Sie beruht auf der Beobachtung der physiologischen Reaktionen von Mikroorganismen und besonders Bakterien als Reagens auf Sauerstoff. (Vgl. S. 1291.)

Die Methode erfordert die Anwendung eines guten Mikroskopes und verschiedener Nebenapparate. Auch setzt sie einige Übung im mikroskopischen Arbeiten voraus.

Es wird die Sauerstoffproduktion eines kleinen Pflanzenteiles im Lichte aus den Bewegungserscheinungen von Bakterien erschlossen, die dem mikroskopischen Präparate beigegeben werden. Das Deckglas, das das Präparat einschließt, wird mit Vaseline oder Wachs luftdicht aufgekittet. Im Dunkeln verzehren die Bakterien im Verein mit dem eingeschlossenen zu prüfenden Pflanzenteile den Sauerstoff. Sie werden dadurch unbeweglich. Am Lichte wird Sauerstoff produziert, und die Bewegung beginnt sofort wieder. Außerdem sammeln sich die Bakterien um die Sauerstoffquelle auf Grund ihrer chemotaktischen Reizbarkeit (Fig. 272).

Fig. 272.



*Engelmann*sche Bakterienmethode. Die Bakterien sammeln sich um eine in der Mitte des Präparates [illegible] A[illegible]. (Aus *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl. [illegible])

Die Methode gestattet:

1. festzustellen, ob irgend ein Organismus überhaupt Sauerstoff produziert;

2. mikroskopische Objekte auf ihre Assimilationsfähigkeit zu untersuchen, auch wenn diese so gering ist, daß sie auf andere Weise nicht nachgewiesen werden kann;

3. den Ort der Sauerstoffabscheidung selbst innerhalb der Zelle zu lokalisieren;

4. die Prüfung verschiedenfarbigen Lichtes, dessen Wellenlänge, Absorption und assimilatorische Wirksamkeit gemessen werden kann.

Als Reagens auf Sauerstoff sind die verschiedensten mikroskopischen, beweglichen Organismen verwendbar, z. B. auch Infusorien (*Engelmann*, 1881. S. 441). Besser aber sind Bakterien, und von diesen wieder besonders die gewöhnlichen Fäulnisbakterien, die unter dem Namen Bacterium termo

[1]) *Th. W. Engelmann*, Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen. Bot. Ztg. 39. Jahrgang 1881. S. 441; *Pflügers* Archiv. Bd. 25. 1881. S. 258; Über Sauerstoffausscheidung von Pflanzenteilen im Mikrospektrum. Bot. Ztg. 40. Jahrg. 1882. S. 419; Farbe und Assimilation. Bot. Ztg. 41. Jahrg. 1883. S. 1; Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenteilen. Bot. Ztg. 42. Jahrg. 1884. S. 84 u. 97; Zur Technik und Kritik der Bakterienmethode. Bot. Ztg. 44. Jahrg. 1886. S. 43 u. 64; Die Farben bunter Laubblätter und ihre Bedeutung für die Zerlegung der Kohlensäure im Lichte. Bot. Ztg. 45. Jahrg. 1887. S. 481; Die Erscheinung der Sauerstoffausscheidung chlorophyllhaltiger Zellen im Licht bei Anwendung der Bakterienmethode. *Pflügers* Archiv. Bd. 94. 1894. S. 375.

Cohn zusammengefaßt werden, und die z. B. bei der Fäulnis einer Erbse in Wasser auftreten. Auch andere sind brauchbar, doch sollen sie für den vorliegenden Zweck ein hohes Sauerstoffbedürfnis haben und weder zu groß noch zu klein sein (*Engelmann*, 1886, S. 49). Es soll nur eine Art von Bakterien im Präparate vorhanden sein. Daher ist das zu prüfende Objekt vorher abzuwaschen. Auch ist es empfehlenswert, Reinkulturen zu verwenden und anstatt Wasser eine verdünnte neutralisierte Lösung von Fleischextrakt zu benutzen, da in dieser die Bakterien beweglicher sind.[1]

Es ist geboten, so viel Bakterien zuzusetzen, daß der Tropfen bei Betrachtung mit bloßem Auge schwach getrübt aussieht (*Engelmann*, 1886, S. 50). Handelt es sich darum, besonders kleine Spuren von Sauerstoff nachzuweisen, so kann man zweckmäßig Bakterien nehmen, die ein geringeres Bedürfnis an diesem Gase haben, also etwa Spirillen, auf die das meist zutrifft. Leicht kultivierbar ist das Spirillum rubrum Esmarch.[2]

Besonders wichtig ist die Möglichkeit, die assimilatorische Wirksamkeit der einzelnen Spektralbezirke festzustellen. Zu diesem Zwecke entwirft *Engelmann* mit Hilfe eines besonderen unter dem Mikroskoptische angebrachten Apparates ein mikroskopisches Spektrum in der Ebene des Objektes. Der *Zeiss*sche Mikrospektralapparat findet sich beschrieben bei *Engelmann*, 1882, S. 419/20. Er besteht aus einem Spiegel, einem verstellbaren Spalt, einer Kollimatorlinse, einem geradsichtigen Prisma und einem auswechselbaren Objektivsystem zum Entwerfen des Spektralbildes des Spaltes.

Alles nicht von unten kommende Licht muß vom Präparate abgehalten werden. Man arbeitet daher im Dunkelzimmer und benutzt entweder das durch einen Heliostaten reflektierte und durch Mattscheiben abgeschwächte Sonnenlicht oder eine geeignete künstliche Lichtquelle. Auch soll das Mikroskop noch von einem Kasten umgeben sein, der Seitenlicht abhält (*Engelmann*, 1886, S. 52). Man kann aber bequemer an Stelle dessen eine kleine Schachtel (etwa photographische Plattenschachtel 6×9) verwenden, die oben und unten eine runde Öffnung besitzt und so auf den Objekttisch gesetzt wird, daß das darin befindliche Präparat von unten beleuchtet und von oben beobachtet werden kann.

Die relative assimilatorische Wirksamkeit der einzelnen Spektralbezirke kann nach *Engelmann* auf zwei Wegen geprüft werden. Der erste, leichter zu verfolgende, gibt ein anschauliches Bild und wertvollen Anhalt für den exakteren zweiten.

1. Die Methode der simultanen Beobachtung. Ein möglichst dünnes, zylindrisches, gleichmäßig gefärbtes Objekt wird senkrecht zur Richtung der *Fraunhofer*schen Linien eingestellt, so daß es mit sämtlichen Spektralfarben belichtet ist. Geeignete Objekte sind Fadenalgen, Oscillarien.

---

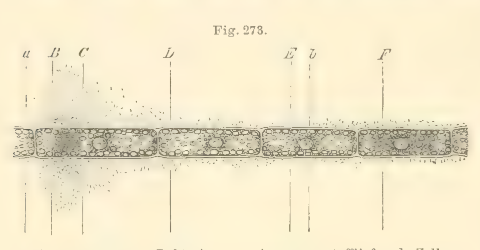
1) *W. Pfeffer*, Über chemotaktische Bewegungen von Bakterien, Flagellaten und Volvocineen. Untersuch. aus dem botan. Inst. zu Tübingen. Bd. 2. 1888. S. 589 und Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Bd. 1. 1897. S. 293.

2) *W. Pfeffer*, Pflanzenphysiologie, [illegible] — Reinkulturen sind erhältlich von *Králs* Bakteriol. Museum. Prof. *Kraus* und Dr. *Pribram*, Wien IX, Zimmermannstraße 3.

lange Diatomeen oder Diatomeenketten u. dgl. Die im Präparat anwesenden, vorher im Dunkeln zur Ruhe gekommenen Bakterien beginnen bei der allmählichen Öffnung des Spaltes zuerst da beweglich zu werden, wo am meisten Sauerstoff produziert wird. Bei einer gewissen Spaltweite geben die Bakterien durch ihre Anordnung gewissermaßen eine graphische Darstellung der Assimilationsenergie in den einzelnen Bezirken, indem sie da am meisten sich anhäufen und auf die größte Entfernung hin beweglich werden, wo am meisten Sauerstoff produziert wird (Fig. 273). Die Methode beruht also auf dem Beweglichwerden (Chemokinesis) und auf der Anlockung (Chemotaxis) der Bakterien durch Sauerstoff. Die Gründe, warum die Methode der simultanen Beobachtung nicht quantitativ auszuwerten ist, gibt *Engelmann*, 1886, S. 44.

2. Die Methode der sukzessiven Beobachtung. Ein ähnliches Objekt wird genau in die Richtung der *Fraunhofer*schen Linien eingestellt, so daß es monochromatisch beleuchtet ist.

Fig. 273.



Ansammlung von Bakterien um eine samenstoffliefernde Zellreihe von Oedogonium im Spektrum. Die hauptsächlichste Ansammlung der Bakterien befindet sich zwischen *B*—*C*. Das Absorptionsband an dieser Stelle wurde im Faden angedeutet. (Nach *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. I.)

Es wird für jede Wellenlänge die Spaltbreite gesucht, bei der die Bewegung gerade beginnt oder aufhört. Die Lichtquelle muß konstant sein. Es ist zu beachten, daß bei roter Beleuchtung die Beobachtung erschwert ist. Damit dadurch keine Fehler entstehen, ist die Helligkeit der fürs Auge wirksameren Strahlen entsprechend abzudämpfen, also bei Messung im Gelb und Grün zweckmäßig ein gefärbtes Glas vors Auge zu halten (1886, S. 64).

Da die Helligkeit der Spaltbreite proportional gesetzt werden kann, ergibt sich aus dieser ein Anhalt für die relative assimilatorische Wirkung der Strahlen verschiedener Wellenlänge. Diese ist umgekehrt proportional derjenigen Spaltbreite, bei der die Bewegung eben beginnt.

Die assimilatorische Wirksamkeit vergleicht *Engelmann* (1884) mit der Absorption der betreffenden Strahlen durch den Pflanzenteil, die ein von ihm angegebenes Mikrospektralphotometer von *Zeiss* zu messen erlaubt.

Der Nachweis, daß nur die Chloroplasten Sauerstoff frei machen, gelang *Engelmann*[1]) auf folgende Weise. Er projizierte mit Hilfe eines an

---

[1]) *Engelmann*, Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen. Botan. Zeitung. 1881. Bd. 39. S. 446. — Die Erscheinung der Sauerstoffausscheidung chlorophyllhaltiger Zellen im Lichte bei Anwendung der Bakterienmethode. *Pflügers* Archiv. 1894. Bd. 57. S. 375.

Stelle des Beleuchtungsapparates angebrachten Mikroskopobjektives das Bild eines hell beleuchteten, kleinen Loches in einem undurchsichtigen Schirm in die Ebene des mikroskopischen Objektes. Um dabei die durch den gewöhnlichen Spiegel erzeugten doppelten Bilder zu vermeiden, kann man ein total reflektierendes Prisma[1]) oder einen an der Oberfläche versilberten Spiegel verwenden. Wird nun ein Objekt benutzt, an dem sich chlorophyllfreie Stellen finden und werden nur diese beleuchtet, so tritt die Wirkung nicht ein. Berührt der helle Kreis aber Chloroplasten, so werden an dieser Stelle die Bakterien beweglich und sammeln sich an (Fig. 274).

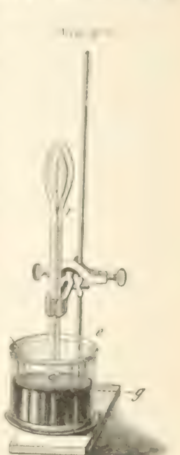
Fig. 274.



Spirogyrazelle mit Bakterien im Präparat eingeschlossen. Zwei Lichtflecke, von denen nur der eine das Chlorophyllband trifft. Dort allein sammeln sich die Bakterien. (Nach *Engelmann* aus *Jost*, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie, 2. Aufl.)

Der Einfluß äußerer Faktoren, wie Temperatur, Zusammensetzung der Flüssigkeit u. dgl. läßt sich mit der Bakterienmethode kaum prüfen. Auch können mit ihrer Hilfe nur sehr kleine Objekte auf Sauerstoffproduktion untersucht werden. Darin liegen die Grenzen dieser eleganten Methode. Aber für die genannten Zwecke stehen die oben erwähnten Hilfsmittel zur Verfügung, so daß wohl für jeden Fall das Geeignete zu finden sein dürfte.

Fig. 275.



Apparat zur Bestimmung der von ... [illegible] ... (Aus Pfeffer, Pflanzenphysiologie, 2. Aufl., Bd. I.)

b) Verbrauch der Kohlensäure.

Durch die Assimilation wird die Umgebung an Kohlensäure ärmer. Man kann einen Strom von Luft mit bekanntem Kohlensäuregehalte über die Pflanze leiten und die verschwundene Kohlensäuremenge messen.

Die Methoden sind die allgemeinen der Gasanalyse (vgl. Bd. III).

Pfeffer[2]) ließ Blätter von Landpflanzen, die in ein oben kolbig erweitertes und im zylindrigen Teile kalibriertes Glasrohr eingeschlossen waren, in kohlensäurereicher Luft assimilieren und bestimmte durch Absorption mit Kalilauge volumetrisch die Menge der verbrauchten Kohlensäure (Fig. 275). Die Einführung des Blattes geschah mit Hilfe eines Holzstäbchens, wobei die Blattfläche vorsichtig gerollt wurde, um das Glasrohr passieren zu können. Am Blattstiele war ein Draht befestigt, der es erlaubte, das Blatt wieder herauszuziehen. Der ausgebauchte Teil des Apparates hatte ein inneres

[1]) *Engelmann*, Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht. Botanische Zeitung. 1888. Bd. 46. S. 668.

[2]) *Pfeffer*, Die Wirkung farbigen Lichtes auf die Zersetzung der Kohlensäure in Pflanzen. Arbeiten des botan. Instituts in Würzburg. Bd. 1. 1874. S. 14 ff.

Volumen von 45 cm^3, das Rohr war 26 cm lang und faßte 40 cm^3. Unten war es durch Quecksilber abgeschlossen, über dem sich eine kleine Menge Wasser befand, um die schädlichen Quecksilberdämpfe zu vermeiden. Zum Versuche wurde das Quecksilber durch Saugen an einem oben an der Erweiterung des Rohres angebrachten Rohransatz gehoben und dann von unten her ein bestimmtes Volumen Kohlensäure eingefüllt. Nach der Belichtung wurde das Blatt durch das Quecksilber hindurch herausgezogen und mit Hilfe einer gebogenen Pipette eine sehr kleine Menge starker Kalilauge von unten eingeführt. Dadurch wurde die Absorption der noch übrigen Kohlensäure bewirkt, die am nächsten Morgen als beendet betrachtet wurde.

Durch Berechnung wurde aus dem Gasvolumen vor der Exposition am Lichte und nach der Absorption unter Berücksichtigung des Blattvolumens die zersetzte Kohlensäuremenge gefunden.

c) Nachweis der Assimilationsprodukte.

Das erste, mikroskopisch unmittelber sichtbare Assimilationsprodukt ist bei den höheren Pflanzen die Stärke, die bei den meisten unter ihnen gebildet wird. Sie läßt sich zwar in geeigneten Präparaten vielfach ohneweiters mikroskopisch erkennen; sehr viel bequemer wird aber ihr Nachweis durch mikrochemische Färbung mit Jod. Zu dem Zwecke läßt *Sachs*[1]) feine Schnitte einige Tage in Kalilauge liegen, wäscht sie gut aus, neutralisiert mit Essigsäure und legt sie nach abermaligem Waschen in verdünnte Jodlösung resp. Jod-Glyzerin (starke alkoholische J-Lösung bis zur Gelbfärbung zu Wasser oder Glyzerin gesetzt). Nach *Schimper*[2]) fügt man etwas Jodjodkaliumlösung (0·05 g J und 0·2 KJ in 15 g Wasser) zu Chloralhydratlösung (8 Teile Chloralhydrat auf 5 Teile Wasser) hinzu und legt da hinein die in Alkohol extrahierten Schnitte. Die Präparate werden so durchsichtiger und klarer, das Chlorophyll wird gelöst, die Stärke quillt und färbt sich schön blau. Bequemer als mit Querschnitten größerer Blätter arbeitet man mit dünnen Blättern, z. B. von Impatiens, den Blättchen von Elodea und von Moosen oder mit Algenfäden, z. B. Cladophora oder Spirogyra. Diese können ohne Zerkleinerung mikroskopisch untersucht werden.

Bei vielen Blättern kann der mikroskopische Stärkenachweis durch ein Verfahren ersetzt werden, das den Stärkegehalt mit bloßem Auge zu prüfen erlaubt, die *Sachs*sche Jodprobe.[3]) *Sachs* brüht die Blätter in

[1]) *Sachs*, Über den Einfluß des Lichtes auf die Bildung des Amylums in den Chlorophyllkörnern. Botan. Zeitung. Bd. **20**. 1862. S. 368 und Über die Auflösung und Wiederbildung des Amylums in den Chlorophyllkörnern bei wechselnder Beleuchtung. Bd. 22. 1864. S. 291.

[2]) *Schimper*, Über Bildung und Wanderung der Kohlehydrate in den Laubblättern. Botan. Zeitung. 1885. S. 735.

[3]) *Sachs*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Ernährungstätigkeit der Blätter. Arbeiten des botan. Instituts in Würzburg. Bd. **3**. 1884. S. 2 oder Gesammelte Abhandl. Bd. **1**. Leipzig 1892. S. 355.

viel kochendem Wasser und legt sie dann in 96%igen warmen Alkohol. Dadurch werden die meisten Blätter ganz farblos, bei größerem Gerbstoffgehalte freilich bleiben sie braun und sind deshalb weniger geeignet. Nun werden sie in eine starke Jodlösung gelegt, die dadurch erhalten wird, daß eine konzentrierte alkoholische Lösung mit so viel destilliertem Wasser versetzt wird, bis sie die Färbung dunklen Bieres erhält. Auch kann man durch Auflösen von 1 Gewichtsteil Jod und 4 Teilen Jodkalium in 300 Teilen Wasser eine konzentrierte Lösung herstellen, die in derselben Weise mit Wasser zu verdünnen ist. Nach einer halben bis zu einigen Stunden, wenn die Farbe sich nicht mehr ändert, ist die Reaktion beendet. Stärkehaltige Blätter erscheinen nun tief schwarz, stärkefreie hell ledergelb. Man legt sie in Wasser auf einen weißen Teller, wobei sie allmählich eine blaue Farbe annehmen.[1]) Bei Blättern und anderen Objekten, die nicht durchsichtig oder farblos genug werden, empfiehlt es sich, dem Alkohol, der zur Extraktion benutzt wird, Chloralhydrat zuzusetzen. Zu große Mengen davon können aber die Stärke lösen.

Über das Verhalten verschiedener Blätter findet man bei *Sachs* (a. a. O.) zahlreiche Angaben. Will man die makroskopische oder die weit sicherere[2]) mikroskopische Jodprobe zum Nachweis stattgehabter Assimilation verwenden, so muß man von grünem, aber stärkefreiem Materiale ausgehen. Die Entstärkung findet vielfach in warmen Nächten vollständig statt, indem durch Ableitung und Veratmung das am Tage angesammelte Assimilationsprodukt verschwindet. Durch längere Verdunklung läßt sie sich in fast allen Objekten erzielen, besonders wenn man Topfpflanzen oder jedenfalls größere Zweige verwendet und sie dunkel und warm hält. Nur die Schließzellen der Spaltöffnungen und die Zellen der Blattnerven halten die Stärke oft hartnäckiger fest. Elodeapflanzen oder Spirogyra sind durch Verdunklung in einem größeren Wasserquantum gleichfalls stärkefrei zu bekommen, bei günstiger Temperatur schon in einem Tage.[3])

Außer durch Verdunklung kann man die Stärke auch durch Überführen des Objekts in einen kohlensäurefreien Raum entfernen.[4]) Die Wirkung der Dunkelheit, die eventuell störende Nebenerfolge haben kann, wird dadurch vermieden.

Von geformten Assimilationsprodukten kommt noch bei Rotalgen die „Florideenstärke" in Betracht. Gelöste Stoffe sind im allgemeinen zu umständlich nachzuweisen, als daß sie als Zeichen stattgefundener Assimilation in Betracht kämen.

Über die relative Menge der gebildeten Stärke kann man sich am mikroskopischen Bilde orientieren oder bei der Jodprobe an der Farbe,

---

[1]) *Detmer*, Das kleine pflanzenphys. Prakt. Jena 1905. 2. Aufl. S. 25.

[2]) *H. Winkler*, Untersuchungen über die Stärkebildung in den verschiedenartigen Chromatophoren. Jahrbücher für wissensch. Botan. Bd. 32. 1898. S. 3.

[3]) *Detmer*, a. a. O. S. 28.

[4]) *Moll*, Über die Herkunft des Kohlenstoffs der Pflanzen. Arbeiten des botan. Instituts zu Würzburg. Bd. 2. S. 110.

die die Objekte bei gleicher Behandlung annehmen. *Sachs*[1]) unterscheidet folgende Färbungen an den mit Jod gesättigten Blättern:

1. Hellgelb oder ledergelb (keine Stärke).
2. Schwärzlich (sehr wenig Stärke).
3. Mattschwarz (reichlich Stärke).
4. Kohlschwarz (sehr reichlich Stärke).
5. Metallischglänzend schwarz (Maximum des Stärkegehaltes).

Durch Aufbewahren in Jodalkohol lassen sich Vergleichsobjekte bei konstanter Färbung erhalten. In flacher Wasserschicht geht die Tiefe des Tones durch Verflüchtigung des Jodes sehr bald zurück. *Sachs*[2]) hat auch durch Bestimmung des Trockengewichtes möglichst analoger Blattstücke vor und nach der Assimilation eine Vorstellung von der Stärke der Stoffspeicherung zu bekommen gesucht.

Ein genaueres Maß für die Menge der in einem Pflanzenteile enthaltenen Stärke bekommt man durch quantitativ-chemische Bestimmung. Das Material wird getrocknet und gepulvert, mit Wasser, Alkohol und Äther ausgelaugt. Dann wird entweder die Stärke durch Alkalien verkleistert, mit Alkohol gefällt und nach nochmaligem Auswaschen mit Alkohol und Äther als solche gewogen[3]) oder, nach Verkleisterung, durch Diastase verzuckert und mit *Fehling*scher Lösung titriert.[4]) Weitere Angaben und Literatur über den chemischen Teil der quantitativen Stärkebestimmung geben z. B. *Beilstein*[5]), *Czapek*[6]) und *König*[7]). Daselbst auch Vorschriften über die Verzuckerung mit Säure, die vorsichtig gehandhabt werden muß, um nicht Glukose zu zerstören. Angaben über Darstellung von Diastase (ebenda) sind jetzt überflüssig, weil dieses Ferment in guter Beschaffenheit käuflich zu haben ist.

Die Menge der gebildeten Stärke oder anderer Polysaccharide gibt nun innerhalb gewisser Grenzen ein Maß für die Intensität der Kohlensäure-Assimilation unter den betreffenden Bedingungen. Doch darf man nicht beides proportional setzen, da noch andere Stoffe als Stärke entstehen und mit der Anhäufung der Reaktionsprodukte der Assimilationsvorgang zurückgeht, und zwar in abgeschnittenen Blättern oder kleineren Zweigen schneller als in großen Pflanzen, bei denen eine Ableitung der Assimilate stattfinden kann.[8]) Es muß auch berücksichtigt werden, daß in

[1]) *Sachs*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Ernährungstätigkeit der Blätter. Arb. d. bot. Inst. zu Würzburg. Bd. 3. 1884. S. 4.

[2]) A. a. O. S. 19.

[3]) *Baumert* und *Bode*, Zur Bestimmung des wahren Stärkegehaltes der Kartoffel. Zeitschr. f. angew. Chemie. 1900. Bd. 13. S. 1074 und 1111.

[4]) *Brown* und *Morris*, A contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. Journal chem. soc. 1893. S. 603.

[5]) *Beilstein*, Handbuch der organ. Chemie. 3. Aufl. Bd. 1. S. 1084/85.

[6]) *Czapek*, Biochemie der Pflanzen. Jena 1905.

[7]) *König*, Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe. Zweite Aufl. 1898.

[8]) *Saposchnikoff*, Bildung und Wanderung der Kohlehydrate in den Laubblättern. Berichte d. deutsch. botan. Ges. 1890. Bd. 8. S. 233. — Über die Grenzen der Anhäufung

wurzellosen Pflanzenstücken durch Mangel an Nährsalzen ein Wachstum unmöglich gemacht wird, durch das Kohlehydrate verarbeitet werden könnten. Die Proportionalität zwischen Assimilation und Stärkeproduktion wird ferner durch die Atmung gestört, und zwar wird ein relativ desto größerer Teil der Assimilationsprodukte veratmet, je schwächer das Licht und je höher die Temperatur ist. Unter günstigen Bedingungen, also bei mittlerer Temperatur und günstigem Lichte wird der 10.—40. Teil von dem zerstört, was das Blatt produziert.[1])

Alle diese Gründe lassen die Methode der Stärkebestimmung als Maß der Assimilation nur bei Berücksichtigung aller Fehler brauchbar erscheinen. Die Bestimmung des Gaswechsels dürfte, wo sie nicht aus anderen Gründen zu verwerfen ist, stets genauere Resultate geben.[2])

C. Chemische Reizbarkeit.

Einleitung.

Da die Biochemie alle im Organismus sich abspielenden chemischen Vorgänge umfaßt, so hat man ein Recht, auch die Reizung durch chemische Stoffe zu ihrem Gebiete zu rechnen. Aus theoretischen Gründen darf man nämlich annehmen, daß ein Eindringen des Reizstoffes und chemische Veränderungen im Innern der Zellen für das Zustandekommen der Perzeption erforderlich sind, obgleich sie noch in keinem Falle nachgewiesen worden sind.

Eine Schilderung der Methoden wird an dieser Stelle auch deshalb von Wert sein, weil das bezeichnete Gebiet eine Fülle von Problemen bietet, die nur einer hoch ausgebildeten chemischen Forschungsweise zugänglich sind und die gleichzeitig gewisse biologische Erfahrungen voraussetzen.

Es werden nur die an Pflanzen und Protozoen zu studierenden chemischen Reizwirkungen Berücksichtigung finden.

Unter ihnen sind allein diejenigen eingehender bekannt, in denen eine leicht sichtbare Veränderung, vor allem eine Bewegungserscheinung, Kunde von der stattgehabten Reizung gibt. Die erkennbare Veränderung nennt man den Reizerfolg oder die Reizreaktion, den chemischen Stoff das Reizmittel. Bemerkbar wird die Reizwirkung eines physikalischen oder chemischen Agens erst durch seine zeitlich oder örtlich verschiedene Ver-

---

der Kohlehydrate in den Blättern der Weinrebe und anderer Pflanzen. Ber. d. deutsch. botan. Ges. 1897. Bd. **9**. S. 293. — Beiträge zur Kenntnis der Grenzen der Anhäufung von Kohlehydraten in den Blättern. Ber. d. deutsch. botan. Ges. 1893. Bd. **11**. S. 391.

[1]) *Kreusler*, Über eine Methode zur Beobachtung der Assimilation und Atmung der Pflanzen und über einige diese Vorgänge beeinflussende Momente. Landwirtschaftl. Jahrb. 1885. Bd. **14**. S. 952.

[2]) *Pfeffer*, Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Bd. **1**. 1897. S. 306.

teilung, also z. B. durch einen Wechsel oder eine Ungleichheit der Intensität oder Konzentration. Diese Umstände nennt man Reizanlaß.[1])

Oft ist der wirkliche Reizanlaß nicht ohne weiteres zu erkennen. So kann die örtliche Konzentrationsdifferenz an einem Stoffe in einem flüssigen Medium durch die Bewegung des Organismus selbst für diesen zu einer zeitlichen werden. Diese Unterscheidung kommt freilich methodisch heute noch wenig in Betracht. In allen den Fällen, wo durch chemische Einflüsse eine bestimmt gerichtete Bewegung veranlaßt wird, gilt es, eine örtliche Verschiedenheit der Konzentration des Reizstoffes zu schaffen und aufrecht zu erhalten. Bei allen anderen chemischen Reizwirkungen kommt es nur darauf an, den zu prüfenden Stoff überhaupt in geeigneter Weise zuzuführen.

Bei den Richtungsbewegungen durch chemische Stoffe müssen wir unterscheiden zwischen den durch Wachstumskrümmungen und den durch freie Ortsbewegung, also Schwimmen und Kriechen, zustande kommenden Reaktionen auf chemische Reize. Die ersteren faßt man als Chemotropismus, die letzteren als Chemotaxis zusammen. Der durch den verschiedenen Bewegungsmodus hervorgerufenen Differenz in der Geschwindigkeit der Reaktion (oder vielmehr in dem Verhältnis zwischen der Größe des bewegten Teiles und der Schnelligkeit der Bewegung) muß durch eine verschiedene Methodik Rechnung getragen werden.

I. Chemotaxis.

Bei der Chemotaxis durch Schwimmbewegung ist die örtliche Konzentrationsdifferenz in dem als Medium dienenden Wasser nicht allzu schwer aufrecht zu erhalten. Denn die relativ große Geschwindigkeit der Bewegung bedingt auch eine schnelle Reaktion, die daher ausgeführt wird, bevor durch Strömung und Diffusion der Reizanlaß unwirksam geworden ist. Die kriechenden Organismen schließen sich dagegen in der Beziehung mehr den chemotropischen an.

Chemotaktische Reaktionen sind bei der Mehrzahl der freibeweglichen Protozoen, Flagellaten, Volvocineen, sowie den schwimmfähigen Stadien der Pilze und Algen und den Spermatozoen der Tiere, Moose und Farne bekannt oder doch zu erwarten. Sie stehen entweder im Dienste der Ernährung, indem sie den Organismus nach geeigneten Nahrungsquellen hinführen oder der Fortpflanzung, indem sie das „Samentierchen" zum Ei geleiten. Auch wird vielfach ein geeigneter Sauerstoffgehalt des Wassers aufgesucht, wodurch die Atmung in entsprechender Weise aufrecht erhalten wird. Ferner werden schädliche Stoffe gemieden, auch solche, die nur durch osmotische Wasserentziehung gefährlich werden könnten, also nicht eigentlich durch chemische Einflüsse.

---

[1]) *Rothert*, Beobachtungen und Betrachtungen über taktische Reizerscheinungen. Flora. Bd. 88. 1901. S. 371, 392.

Kapillarmethode.

Das Studium der chemotaktischen Reizerscheinungen gegen gelöste Stoffe wurde zum ersten Male von *Pfeffer*[1]) in Angriff genommen, der die noch heute allgemein benutzte Methodik geschaffen hat. Die Konzentrationsdifferenz des Reizstoffes wird nach ihm dadurch hergestellt, daß zu dem mikroskopischen Präparate eine feine Glasröhre, gefüllt mit einer Lösung der Substanz, geschoben wird. Aus der Öffnung der Glasröhre oder „Kapillare" dringt der Reizstoff heraus und verbreitet sich allmählich in dem Wasser, das die Organismen enthält. Der Reizerfolg macht sich in der Anlockung und Ansammlung vor oder in der Kapillare geltend, resp. darin, daß gerade diese Stelle gemieden wird. In dem ersten Falle spricht man von positiver, im zweiten von negativer Chemotaxis.

Die Herstellung der Kapillaren erfolgt durch Ausziehen eines vorher über der Flamme weich gemachten Glasrohres. Dieses muß auf das Sorgfältigste gereinigt werden, da viele chemotaktische Organismen äußerst empfindlich gegen Spuren der verschiedensten Stoffe sind. Man kann bei einiger Geschicklichkeit aus jedem Rohre genügend feine Kapillaren ziehen. Doch wird man zur Erzielung der feinsten Kaliber zweckmäßig dünnere Röhren anwenden. Die Dicke der Kapillaren richtet sich nach der Größe und Geschwindigkeit der einzufangenden Organismen. Ist die Bewegung langsam, so wird eine größere Menge des Reizstoffes erfordert, damit nicht die Konzentrationsdifferenz sich zu früh ausgleiche. Also wird man dickere Kapillaren wählen. Das gleiche gilt für größere Organismen, wie Paramäcien, Euglenen u. dgl., schon wegen deren Körperumfang, aber auch wegen der durch ihre Bewegungen verursachten Durchmischung der Flüssigkeit. Für Bakterien sind Kapillaren von etwa 0·05—0·1 *mm*, für Samenfäden von Farnen etc. solche von 0·1—0·15 *mm*, für größere Organismen solche von 0·2—0·4 *mm* lichter Weite geeignet. Die Länge möge 10—20 *mm* betragen. Doch kommt es darauf weniger an. Um einigermaßen glatte Ränder an der gewünschten Stelle zu bekommen, breche man die Kapillaren über die Kante eines Objektträgers.

Pfeffer schmilzt die Kapillaren an einem Ende zu und füllt sie unter der Luftpumpe mit der zu prüfenden Lösung, indem er sie in einem Uhrschälchen unter die Glocke setzt und mäßig evakuiert. Durch die nur geringe Luftverdünnung wird erreicht, daß sowohl in der Flüssigkeit wie auch in der Kapillare hinter dem eingesogenen Tröpfchen Luft zurückbleibt. Würde man zu stark auspumpen, so würde ein Mangel an Sauerstoff eintreten, der die Beweglichkeit vermindern und zudem falsche Reaktionen vortäuschen könnte. (Vgl. unten S. 1291 Aërotaxis.)

Bei sehr sauerstoffbedürftigen Organismen muß aus demselben Grunde im offenen Tropfen und nicht unterm Deckglase beobachtet werden. Doch wird man das nur tun, wenn man sich durch besondere Versuche über-

---

[1]) *Pfeffer*, Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. Untersuchungen aus dem Botan. Institut zu Tübingen. Bd. 1. 1881—85. S. 363.

zeugt hat, daß es nötig ist. Denn das Eindunsten des Tropfens kann Täuschungen bewirken. Auch zerläuft der Tropfen gern auf dem Objektträger. In den organismenhaltigen Tropfen wird die in Wasser äußerlich gut abgespülte Kapillare hineingeschoben. Dann wird sogleich mit entsprechender, nicht zu starker Vergrößerung beobachtet. Vielfach ist der Erfolg selbst mit bloßem Auge zu erkennen. In schwierigen Fällen leistet Dunkelfeldbeleuchtung vortreffliche Dienste.[1])

Bei lichtempfindlichen Organismen, z. B. Purpurbakterien oder grünen Flagellaten, muß man die Ansammlung im Dunkeln vor sich gehen lassen oder bei einer Beleuchtung arbeiten, die wohl auf das Auge, nicht aber auf die Versuchsobjekte einwirkt. In beiden Fällen arbeitet man im Dunkelzimmer oder stellt das Mikroskop in einen lichtdichten Kasten, der nur eine Öffnung zur Beleuchtung des Spiegels und eine zur Beobachtung enthält. Bei den meisten Pflanzen hat rotes Licht keine Reizwirkung. Man kann daher ohne Störung bei dem Lichte einer photographischen Dunkelkammerlampe mikroskopieren. In jedem Falle muß man sich aber von der Unwirksamkeit der gewählten Beleuchtung überzeugen, um nicht durch phototaktische Ansammlungen gestört zu werden. Purpurbakterien reagieren z. B. auf ultrarotes Licht.[2])

Von Bedeutung für die Beurteilung der Resultate ist die Art, wie die beiden Flüssigkeiten, die in der Kapillare und die außerhalb, sich zueinander verhalten. Im allgemeinen wird die zu prüfende Lösung in der Kapillare ein höheres spezifisches Gewicht haben als die Außenlösung. Bei horizontal gestellten Kapillaren wird daher ein Ausfließen stattfinden und dafür etwas von der Außenflüssigkeit eingesaugt werden.[3]) Zu vermeiden wäre diese Fehlerquelle durch Senkrechtstellung der Kapillare und Beobachtung mit dem horizontalen Mikroskope.[4])

Ob die tatsächlich immer zustande kommende allmähliche Vermischung der beiden Flüssigkeiten hauptsächlich kleinen Strömungen oder mehr der Diffusion zuzuschreiben ist, bleibt noch genauer zu untersuchen. Ein Mittel bietet die Beobachtung gefärbter Flüssigkeiten.[5]) Für das Wesen der chemotaktischen Reaktion ist die Beantwortung dieser Frage von Bedeutung, weil durch Diffusion ein regelmäßiges Konzentrationsgefälle von der Kapillare her unterhalten werden würde, bei Verteilung durch Konvektion aber kaum. Diese Unterscheidung wird besonders wichtig, wenn es sich darum handelt, die untere Grenzkonzentration zu finden, die gerade noch wirksam ist, die sogen. Reizschwelle. Derartige Bestimmungen geben

---

[1]) *Pfeffer*, a. a. O. S. 423 u. 431.

[2]) *Engelmann*, Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht. Bot. Ztg. 46. Jahrg. 1888. S. 661.

[3]) *Pfeffer*, Über chemotaktische Bewegungen von Bakterien, Flagellaten und Volvocineen. Untersuch. aus dem botan. Institut zu Tübingen. Bd. 2. 1886—88. S. 582.

[4]) Ebenda. S. 587.

[5]) *Pfeffer*, Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. Untersuchungen aus dem botan. Institut zu Tübingen. Bd. 1. 1881—85. S. 363.

am besten ein Maß für die Reizstärke einer Substanz oder vielmehr für die Empfindlichkeit des Organismus gegen sie.

Pfeffer erklärt die Ansammlung vor oder in der Kapillare in der Weise, daß er annimmt, die Einzelindividuen stellen sich senkrecht zu den Diffusionszonen, die Orte gleicher Konzentration verbinden. Hiernach müßte also auch bei Schwellenbestimmungen schon eine merkliche Diffusion zustande gekommen sein. Ich halte es aber für wahrscheinlicher, daß man bei sofortiger Beobachtung noch beide Flüssigkeiten als fast ungemischt nebeneinanderliegend betrachten kann, und daß die Reizwirkung nur die zufällig in die ausgeflossene Lösung geratenen Individuen daran verhindert fortzuschwimmen (*Pringsheim*[1]).

Um die Schwellenbestimmungen zuverlässiger zu gestalten, kehrt *Kusano*[2]) (S. 73) die *Pfeffer*sche Methode um. Er füllt die organismenhaltige Flüssigkeit, der gleichzeitig der Reizstoff in verschiedenen Konzentrationen beigegeben ist, in nicht zu enge Kapillaren und schiebt diese in einen Tropfen Wasser. Bei den zufällig der Öffnung zustrebenden Individuen findet nun nach einiger Zeit eine Umkehr der Bewegung statt, und zwar bei den höheren Konzentrationen erst außerhalb der Kapillare, bei der Grenzkonzentration aber an der Öffnung selbst. Der Vorteil der Methode besteht darin, daß man einzelne Individuen in ihrem Verhalten beobachten kann, vor allem aber darin, daß der Reizstoff nicht schon zu weit verdünnt sein kann, bevor die Organismen in sein Gebiet gelangen. Dementsprechend zeichnen sich die *Kusano*schen Resultate durch ihre gute Übereinstimmung aus.

Derselbe Forscher bedient sich noch einer anderen Modifikation der *Pfeffer*schen Methodik. Er füllt die Glasröhrchen durch Kapillarität und verschließt sie mit einem Tröpfchen Wachs (a. a. O. S. 5). Hierbei wird das Auspumpen entbehrlich, und es findet eine äußerliche Benetzung der Kapillaren nur an der Mündung statt. Ähnlich hat es *Rothert*[3]) (S. 380) gemacht, um mit Lösungen flüchtiger Stoffe, wie Äther, zu arbeiten, die bei der Füllung unter der Luftpumpe verloren gehen würden.

Barrat[4]) beurteilt die Stärke der Anlockung nach der Zahl der nach bestimmter Zeit eingewanderten Individuen und benutzt zum Vergleich Kapillaren ohne Reizstoff.

Anderweitige Methoden.

Massart[5]) setzt an Stelle der Kapillar- die Tropfenmethode. Er bringt einen Tropfen mit der organismenhaltigen Flüssigkeit und einen

[1]) *E. G. Pringsheim*, Die Reizbewegungen der Pflanzen. Berlin 1912.

[2]) *Kusano*, Studies on the chemotactic and other related reactions of the swarm spores of Myxomycetes. Journal of the College of Agriculture. Imp. Univ. of Tokyo. 1909. Vol. 2. p. 1.

[3]) *Rothert*, Beobachtungen und Betrachtungen über taktische Reizerscheinungen. Flora. Bd. 88. 1901. S. 371.

[4]) *Barrat*, Der Einfluß der Konzentration auf die Chemotaxis. Zeitschr. f. allgemeine Physiol. Bd. 5. 1905. S. 73.

[5]) *Massart*, La sensibilité à la concentration chez les êtres unicellulaires marins. Bull. de l'Acad. roy. de Belgique. 3me série. T. 22. 1891. p. 158.

mit dem Reizstoffe auf eine Glasplatte nebeneinander; dann verbindet er beide vorsichtig durch eine Wasserbrücke und beobachtet die Verteilung der Organismen. Auch verwendet er Splitterchen fester Substanzen, die er dem Tropfen an der Peripherie einverleibt.

Jennings[1]) stellt seine Versuche so an, daß er eine ziemlich dicke Flüssigkeitsschicht zwischen dem Objektträger und einem großen Deckglase erzielt, indem er das letztere durch Glasfäden unterstützt. Dann bringt er mit einer feinen Kapillarpipette einen Tropfen der den Reizstoff enthaltenden Flüssigkeit unter das Deckglas in die Mitte der organismenhaltigen Flüssigkeit. Die dadurch geschaffene Stelle höherer oder niederer Konzentration bleibt lange genug erhalten, um eine Reaktion bewirken zu können.

Garrey[2]) bringt die Organismen in eine flache Kammer und läßt den Reizstoff durch eine feine Öffnung in der Wand hinzufließen.

Zu den Methoden, die dem Studium der Chemotaxis dienen, kann man auch die der Bakterienniveaux nach *Beijerinck*[3]) rechnen. Auf dem Boden eines Reagensglases kommt eine Substanz, die Nahrungsstoffe für Organismen abgibt, also etwa eine Bohne, etwas Nährgelatine oder dergleichen. Darüber wird Wasser geschichtet. Die sich entwickelnden Bakterien und Infusorien halten sich anfangs ganz in der Nähe der Nahrungsquelle. Mit fortschreitender Diffusion aber entfernen sie sich von ihr und bilden in einer gewissen Entfernung vom Wasserspiegel und dem Diffusionszentrum plattenförmige, oft scharf umgrenzte Anhäufungen, die an der weißlichen Trübung leicht zu unterscheiden sind, die „Niveaux". Die Erscheinung beruht darauf, daß die Organismen auf eine gewisse Konzentration der Nahrungsstoffe als die optimale abgestimmt sind und diese aufsuchen. Je mehr Stoffe ins Wasser diffundieren, desto mehr entfernt sich die Zone einer gewissen Konzentration vom Boden des Gefäßes. Außerdem kommt auch das Sauerstoffbedürfnis in der Stellung der Niveaux zum Ausdrucke. Sauerstoffbedürftigere Organismen werden sich dem Meniskus möglichst zu nähern suchen, andere werden mit einer geringeren Tension dieses, in der Tiefe von den Bakterien und Infusorien selbst aufgezehrten Gases zufrieden sein.

So ist jedes Niveau der Ausdruck für das an der betreffenden Stelle herrschende Gleichgewicht anziehender und abstoßender Reizwirkungen. Es kann daher brauchbare Anhaltspunkte für die Bedürfnisse der fraglichen Organismen geben. Eine Methode für exaktere Forschungen läßt sich wegen der Mehrheit der wirkenden Kräfte daraus aber kaum gestalten.

---

[1]) *Jennings,* Reactions in chemical, osmotic and mechanical stimuli in the ciliate infusoria. Journal of Physiology. Vol. 21. 1897. p. 258 und „Das Verhalten der niederen Organismen", Übers. v. *E. Mangold.* Leipzig und Berlin. 1910. S. 76.

[2]) *Garrey,* The effect of ions upon the aggregation of flagellated infusoria. Americ. Journal of Physiol. Vol. 3. 1900. p. 291.

[3]) *Beijerinck,* Über Atmungsfiguren beweglicher Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. Bd. 14. 1893. S. 827 und Notiz über den Nachweis von Protozoen und Spirillen im Trinkwasser. Ebenda. Bd. 15. 1894. S. 799, auch *Stockhausen,* Ökologie, „Anhäufungen" nach *Beijerinck.* Berlin 1897.

Aërotaxis.

Was die chemotaktische Reizung durch den zum Atmen nötigen Sauerstoff anbelangt, so sind allerdings die zu seinem Studium bisher verwendeten Methoden alle nicht sehr exakt. Die Schwierigkeit liegt in dem gasförmigen Zustande des Reizmittels und kehrt bei allen Gasen wieder. Diese müssen natürlich in gelöstem Zustande geboten werden, um eine Reizwirkung auf schwimmende Organismen auszuüben. Eine bestimmte Tension innezuhalten ist dabei recht schwierig.

Die meisten Methoden beruhen auf folgendem: Ist eine organismenhaltige Flüssigkeit luftdicht abgeschlossen, so wird durch die Atmungstätigkeit bald der Sauerstoff verzehrt und dafür Kohlensäure angehäuft. Wird nun an einer begrenzten Stelle der Luft der Zutritt gestattet, so sieht man vielfach die schon bewegungslos gewordenen Organismen wieder aufleben und sich in der Nähe der freien Oberfläche zusammendrängen. Ob sie aber durch Sauerstoff angelockt oder durch Kohlensäure abgestoßen werden, läßt sich nicht ohne weiteres beurteilen und ist meistens nicht genauer geprüft.

Solange die Entscheidung nicht getroffen ist, kann man zweckmäßig den von *Engelmann*[1]) (S. 541) geschaffenen Ausdruck Aërotaxis für diese besondere chemotaktische Reizerscheinung beibehalten, die freilich wohl meist durch ungleiche Verteilung des Sauerstoffes hervorgerufen wird.

Engelmann hat die Aërotaxis bei Bakterien entdeckt und als erste von allen chemischen Reizwirkungen genau studiert. Sie läßt sich am einfachsten so demonstrieren, daß man geeignete Bakterien in einem Tropfen Nährlösung unter ein großes Deckglas bringt. Nach einiger Zeit ist durch die Atmungstätigkeit der Sauerstoffdruck im Präparate soweit gesunken, daß die einseitige Zufuhr dieses Gases von den Rändern oder eingeschlossenen Luftblasen her die Bewegungen zu beeinflussen beginnt. Es findet an diesen Stellen eine dichte Ansammlung der durcheinander wimmelnden Bakterien statt, während in den entfernteren Partien Ruhe eintritt.

In der geschilderten Weise wirkt jede Sauerstoffquelle, also zum Beispiel auch miteingeschlossene grüne Pflanzenteile, die am Lichte die Kohlensäure zerlegen und Sauerstoff frei machen. Diese Erscheinung hat *Engelmann*[2]) sich zur Schaffung seiner „Bakterienmethode" zunutze gemacht. Irgendwelche Pflanzenteile, deren Fähigkeit zur Kohlensäurereduktion geprüft werden soll, werden mit geeigneten Bakterien zusammen unter einem Deckglase eingeschlossen. Wird der Rand desselben mit Vaseline oder besser einer Mischung von Wachs und Vaseline abgedichtet, so kommen die Bakterien im Dunkeln nach einiger Zeit zur Ruhe. Bringt man nun das Präparat ans Licht und unters Mikroskop, so sieht man

---

[1]) *Engelmann*, Neue Methode zur Untersuchung der Sauerstoffausscheidung pflanzlicher und tierischer Organismen. Botanische Zeitung. 1881. 39. Jahrg. S. 541.

[2]) Ebenda.

bald die Bakterien in der Nachbarschaft der Pflanzenzellen wieder beweglich werden und sich nahe an ihnen zusammendrängen, falls Sauerstoff gebildet wird. Diese Methode ist äußerst empfindlich. (Vgl. S. 1278.)

Innerhalb der weiten Grenzen, die zwischen völliger Abwesenheit des Sauerstoffes und den hohen Tensionen liegen, die man durch beliebig gesteigerten Druck einer reinen Sauerstoffatmosphäre erzielen kann, dürfte jedem beweglichen Organismus ein spezifisches „Optimum“[1]) zukommen, das je nachdem durch positive oder negative chemotaktische Reaktionen aufgesucht wird. Um dieses Optimum festzustellen, werden besondere Methoden ausgebildet werden müssen, deren Grundlagen *Engelmann*[2]) geliefert hat.

Dieser Forscher beobachtete (a. a. O. S. 337), daß Spirillen unter dem Deckglase nicht die äußerste Randzone aufsuchen, wie das z. B. Bacterium termo Cohn tut, sondern sich in Form eines zarten Streifens in einiger Entfernung von der Luftgrenze anhäufen. Die Lage des Anhäufungsstreifens ist durch die dort herrschende Sauerstofftension bedingt. Denn leitet man Wasserstoff oder Sauerstoff über das in einer feuchten Kammer liegende Präparat, so nähern sich die Spirillen dem Rande oder entfernen sich von ihm. Würde man die Sauerstoffmenge in einem darüber geleiteten Gasgemenge bestimmen, bei der die Bakterien gerade den Rand erreichen, so wäre damit ihr Optimum bestimmt. Der Sauerstoff müßte dabei in bestimmten Verhältnissen mit den indifferenten Gasen Stickstoff oder Wasserstoff verdünnt werden. Bei sauerstoffbedürftigeren Organismen, die gegen atmosphärische Luft stets positiv reagieren, müßte man reinen Sauerstoff nehmen, der eventuell unter Druck zu bringen wäre. Im Präparat wird durch die Atmung stets Sauerstoff verbraucht und dadurch das Konzentrationsgefälle aufrecht erhalten.

An Stelle von Deckglaspräparaten kann man auch Kapillaren oder weitere Röhren verwenden, die mit der organismenhaltigen Flüssigkeit gefüllt werden. Hierbei wird die Entfernung der aërotaktisch reagierenden Organismen vom Meniskus beobachtet.[3])

In ähnlicher Weise läßt sich auch die chemotaktische Wirkung anderer Gase beobachten. Nur wird bei diesen allmählich das Konzentrationsgefälle sich ausgleichen, weil sie nicht wie Sauerstoff von den Organismen verbraucht werden. Ein solches könnte höchstens für die Kohlensäure bei grünen Organismen am Lichte gelten und für den Schwefelwasserstoff bei den Schwefelbakterien, falls Sauerstoff zugegen ist.[4]) Sonst muß man dafür sorgen, daß das zu prüfende Gas wieder aus der Flüssigkeit entfernt wird, was bei beiderseits offenen Versuchsröhren durch Vorüberleiten eines in-

---

[1]) Dieses Optimum braucht keineswegs dem für dauerndes Gedeihen günstigsten Sauerstoffdrucke zu entsprechen.

[2]) *Engelmann*, Über Sauerstoffausscheidung von Pflanzenteilen im Mikrospektrum. Botan. Ztg. 40. Jahrg. 1882. S. 321 u. 337.

[3]) *Engelmann*, Die Purpurbakterien und ihre Beziehungen zum Licht. Botanische Zeitung. 46. Jahrg. 1888. S. 697—699.

[4]) *Winogradsky*, Über Schwefelbakterien. Botan. Ztg. 45. Jahrg. 1887. S. 515 u. 572.

differenten Gases an dem einen und des chemotaktisch wirksamen am anderen Ende gelingen dürfte. Solche Versuche sind aber meines Wissens bisher nicht angestellt worden.

Das von verschiedenen Organismen jeweilig aufgesuchte Sauerstoffoptimum drückt sich, wie wir gesehen haben, in der Entfernung vom Rande des Deckglases aus, in der die Ansammlung geschieht. *Beijerinck*[1] hat darauf die Methode seiner „Atmungsfiguren" gegründet, die makroskopisch sichtbar sind. Zwischen ein rundes Deckglas und einen Objektträger schiebt man einen U-förmig gebogenen Platindraht. „In den so gebildeten keilförmigen Raum bringt man einen Tropfen Wasser von solcher Größe, daß dadurch ungefähr die Hälfte des Raumes (soll heißen der Fläche) angefüllt, die andere Hälfte, als Luftraum, leer bleibt, wobei ein Meniskus von der Länge der Mittellinie des Deckglases entsteht. Man verteilt in dem Tropfen eine nicht zu geringe Menge der zu beobachtenden Mikroben, möglichst von Kulturen auf festem Substrat. Bei den meisten Bakterien entsteht ein durch bewegungslose Individuen getrübtes Feld. Bei auffallendem Licht und schwarzem Untergrund heben sich jedoch die Atmungsfiguren mit großer Schärfe hervor." (*Stockhausen*, a. a. O. S. 26.) Der Vorteil, der durch die einseitige Hebung des Deckglases erreicht wird, liegt offenbar in der größeren verwendbaren Flüssigkeitsmenge und in dem reichlicheren Sauerstoffzutritt an der freien Oberfläche. Dadurch werden die Figuren kräftiger als im gewöhnlichen Deckglaspräparate. Die Methode ließe sich natürlich gleichfalls zu Messungen umbilden.

II. Chemotropismus.

Bei den Organismen, die an ein festes Substrat gebunden sind, erfolgen die Richtungsbewegungen durch Wachstumskrümmungen[2] oder durch Kriechen auf dem Untergrunde. Beides geht relativ langsam vor sich, so daß der Reizanlaß, also z. B. die Konzentrationsdifferenz eines gelösten Stoffes, länger erhalten bleiben muß, damit eine Reaktion erfolgt, als bei der Chemotaxis. Das ist der Grund, warum die bisher vorliegenden Versuche aus Mangel an einer guten Methode vielfach noch nicht zu befriedigenden Resultaten geführt haben.

Die in Betracht kommenden Objekte mit Wachstumskrümmungen kann man in zwei Klassen einteilen:

1. mit bloßem Auge sichtbare Pflanzenteile, wie Wurzeln und Stengel (eventuell auch Blätter, Wurzelstöcke etc.);

2. mikroskopische Objekte, wie Pollenschläuche, Pilzfäden (und eventuell Wurzelhaare, Algenfäden).

Die beiden Gruppen verlangen eine verschiedene Behandlung.

---

[1]) *Beijerinck*, Über Atmungsfiguren beweglicher Bakterien. Zentralblatt für Bakteriologie. Bd. 14. 1893 und *Stockhausen*, Ökologie, „Anhäufungen" nach *Beijerinck*. Berlin 1907. S. 25ff.

[2]) Die Turgorbewegungen in Gelenken kommen hier nicht in Betracht.

Wurzeln.

Die Pflanze besitzt zweierlei Mittel, diejenigen Regionen des Bodens, die ihr durch chemische und physikalische Beschaffenheit am meisten zusagen, vorzugsweise auszunutzen. Die Wurzeln können entweder mit Hilfe ihrer Reizbarkeit gewisse Stellen durch aktive Krümmungen erreichen oder sich an günstigen Orten durch Anregung ihres Wachstums und ihrer Verzweigung stärker ausbreiten.

Lokale Förderung des Wachstums.

Die Verstärkung der Wurzelbildung durch gewisse Stoffe wurde wohl zuerst von *Du Hamel de Monceau* festgestellt.[1]) Er pflanzte einen Baum so, daß seine Wurzeln die Wahl hatten zwischen guter Humuserde und gewöhnlichem Boden. Die Wurzeln breiteten sich fast nur in ersterem aus. Ähnlich *Knight.*[2]) *Sprengel*[3]) prüfte chemisch bestimmte Stoffe auf ihre Fähigkeit, das Wurzelwachstum anzuregen. Er benutzte einen Kübel, dessen untere Hälfte durch Scheidewände in Kammern geteilt war. In jede kam mit je einem Stoffe gedüngte Erde, darüber gewöhnlicher Boden. Der in letzterem gepflanzte Klee breitete seine Wurzeln unregelmäßig aus und bevorzugte gewisse Kammern. Aus dem Versuche ist wegen der unklaren Bedingungen nicht viel zu schließen. Der Grundgedanke der Methode ist aber nicht übel. *Wiegmann* und *Polstorff*[4]) sahen die Wurzeln und Ausläufer kalkliebender Pflanzen sich vorzugsweise in der Richtung auf einen Kalkhaufen hin ausbreiten. Damit wäre für diesen Fall der wirksame Stoff gekennzeichnet.

Eingehendere Versuche in der Richtung scheinen nicht angestellt worden zu sein. Doch finden sich auch in der neueren Literatur entsprechende Belege. *Nobbe*[5]) schichtete gedüngte und ungedüngte Erde verschiedenartig übereinander und fand die Wurzelentwicklung vorzugsweise in der ersteren lokalisiert. *Höveler*[6]) stellte ähnliche Versuche an, und zwar hinter Glaswänden, so daß das Resultat leicht sichtbar war und photographiert werden konnte (a. a. O., Tafel V). *Müller*-Thurgau und *Frank*[7]) verwendeten Gefäße mit einer Scheidewand. In die beiden so geschaffenen Abteilungen kam steriler Sand, der auf einer Seite gedüngt wurde. So konnte gezeigt werden, welche Stoffe speziell die Wurzelbildung fördern. Auch Wasserkulturen wurden in entsprechender Weise verwendet. Dies dürfte die beste Methode für solche Versuche sein.

Hieran würde sich die Beeinflussung des Wachstums der Wurzeln bei gleichmäßiger Einwirkung schließen. Über spezielle Methodik ist aber nichts zu sagen.

Reizwirkung von Gasen.

Wurzeln in Luft.

Richtungsbewegungen der Wurzeln durch chemische Reize wurden zuerst von *Molisch*[8]) beobachtet. Er befestigte Keimwurzeln vor dem Spalt

[1]) *Du Hamel de Monceau,* 1785. Zitiert nach *Th. A. Knight.* Sechs pflanzenphysiologische Abh. *Ostwalds* Klassiker d. exakten Wissensch. Leipzig 1895. S. 12 u. 13.

[2]) *Knight,* 1811, a. a. O.

[3]) *Sprengel,* 1834. Zitiert nach *Wiegmann* und *Polstorff,* Über die anorgan. Bestandteile d. Pflanzen. Braunschweig 1842.

[4]) *Wiegmann* und *Polstorff,* a. a. O.

[5]) *Nobbe,* Vegetationsversuche in Böden mit lokalisierten Nährstoffen. Die landwirtschaftl. Versuchsstationen. Bd. **10**. 1868. S. 100.

[6]) *Höveler,* Über die Verwertung des Humus bei der Ernährung der chlorophyllführenden Pflanzen. Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik. Bd. **24**. 1892. S. 294.

[7]) *Frank,* Die Assimilation des freien Stickstoffs durch die Pflanzenwelt. Botanische Zeitung. Bd. **51**. 1893. S. 153.

[8]) *Molisch,* Über die Ablenkung der Wurzeln von ihrer normalen Wachstumsrichtung durch Gase (Aërotropismus). Sitzungsber. d. Wiener Akad. Math.-naturw. Kl. 1884.

einer vertikal stehenden Hartgummiplatte, die ein großes Glasgefäß abschloß. In dem Glasgefäß befand sich das zu untersuchende Gas oder ein leicht flüchtiger Stoff. Das ganze wurde mit einer großen Glasglocke bedeckt, deren Innenraum durch eine Wasserschicht abgesperrt und feucht gehalten wurde. Die Methode hat den Mangel, daß der Spalt größere Luftbewegungen erlaubt, durch die ein schnelles Zurückgehen der ungleichen Verteilung des Reizstoffes möglich wird. Auch müßte dafür gesorgt werden, daß keine Feuchtigkeitsdifferenzen entstehen, weil diese selbst eine Krümmung zu bewirken vermögen (Hydrotropismus).

In ähnlicher Weise arbeitete *Sammet*.[1]) Er ließ die Wurzeln in Luft, Wasser oder Erde wachsen. Bei der ersten Methode wurde die Versuchsanstellung von *Molisch* insofern verbessert, als er den Diffusionsschlitz durch Bedecken mit feinem Seidenstoff gegen gröbere Luftbewegungen schützte; daß er ferner durch ständige Zufuhr des Gases in den Zylinder und durch seine Wegschaffung aus der Glocke für längere Erhaltung der Differenzen sorgte.[2]) In den Versuchen mit flüchtigen Stoffen, wie Äther, Alkohol, Aceton etc., ließ er diese von Fließpapier, das eine Glasscheibe überzog, aufsaugen und brachte in deren Nähe die Wurzeln, die nun einseitig von den Dämpfen getroffen wurden.[3]) Weitere Varianten finden sich in der erwähnten Arbeit auf S. 19ff.

Ähnlich ist ferner ein Teil der Versuche von *Bennett*[4]) angestellt. Die Wurzeln befanden sich dabei in einem weiten Glasrohr, das auf beiden Seiten durch engere Röhren mit Behältern in Verbindung stand, die die Versuchsgase, also z. B. Luft und Chlor, enthielten.

Wurzeln in Erde.

Dieselbe Verfasserin hat auch Versuche angestellt, in denen die Wurzeln in Erde wachsen.[4]) Dadurch ist ein natürlicheres Medium gegeben. Die untere Hälfte eines zylindrischen Gefäßes war durch eine senkrechte Scheidewand geteilt. In die beiden Kammern wurden Tonscherben getan, darüber Erde. Am Boden befand sich Wasser. In jede von den beiden Kammern konnte ein Gas geleitet werden, das in die Erde eintrat. Die Wurzeln wurden an der Grenze zwischen den beiden Gasarten, also genau über der Scheidewand eingesenkt. Oder es wurde ein rechteckiger Drahtkorb mit Erde in ein zylindrisches Glasgefäß so eingedichtet, daß seitlich zwei leere Räume blieben. Diese waren nach oben geschlossen und konnten mit Gas gefüllt werden. Die Wurzeln wuchsen in der Erde.

Trotz dieser offenbar recht geschickten Methodik konnte *Bennett* keine Krümmungen erhalten. Die positiven Ergebnisse von *Molisch* und *Sammet* bedürfen also der Nachprüfung.

---

[1]) *Sammet*, Untersuchungen über Chemotropismus und verwandte Erscheinungen bei Wurzeln, Sprossen und Pilzfäden. Jahrb. f. Botanik. Bd. 41. 1905.

[2]) a. a. O. S. 16.

[3]) a. a. O. S. 18.

[4]) *Bennett*, Are roots aerotropic? Botanical Gazette. Vol. 37. 1904.

Letzterer hat gleichfalls Versuche in Erde, ferner auch solche in Sägespänen angestellt. Die Methode ist die von *Molisch,* nur daß der das Gas enthaltende Zylinder in eine große Kiste mit dem lockeren Medium eingegraben und die Wurzeln in dieses gepflanzt wurden.

Reizwirkung gelöster Stoffe.

Wurzeln in Wasser.

Die Versuche, in denen die Wurzeln im Wasser kultiviert wurden, bieten methodisch keine großen Differenzen zwischen der Verwendung gasförmiger und fester Stoffe in Lösung. Sie sollen daher gemeinsam behandelt werden. Auch hier sind eine Menge verschiedener Methoden angewendet worden, ohne daß einheitliche Resultate vorlägen.

Molisch[1]) findet, daß in Wasser eingetauchte Wurzeln sich in einer gewissen Tiefe bogenförmig nach oben krümmen, bis sie mit der Spitze an die Wasseroberfläche gelangen. Er schreibt diese Erscheinung dem Aerotropismus zu.

Durch reichliche Durchlüftung konnte *Ewart*[2]) diese Krümmungen ausschließen.

Bennett[3]) dagegen konnte geradeaus wachsende Wurzeln selbst im Wasser nicht bekommen, das mit Sauerstoff gesättigt war (S. 243). Auch traten keine gleichmäßigen aerotropischen Reaktionen auf, wenn den Wurzeln eine Membran genähert wurde, durch die Sauerstoff, Kohlensäure u. dgl. diffundieren konnte (S. 244). In weiteren Versuchen wuchsen die Wurzeln in Wasser an der Wand eines umgekehrten lufterfüllten Glasbehälters entlang, ohne an der Grenze nach dem Luftraum zu abzubiegen, auch wenn das Wasser sauerstoffarm war (S. 247).

Andere gelöste Stoffe haben *Newcombe* und *Rhodes*[4]) versucht. Sie näherten den in einer Nährlösung mit Ausschluß von Nitrat wachsenden Wurzeln nach Art der Kapillarmethode Glasröhrchen, die mit $NaNO_3$-Lösung gefüllt waren, in anderen Versuchen Fläschchen mit derselben Flüssigkeit, deren Öffnung mit Watte verstopft war, ohne Krümmungen zu erzielen (S. 24). Sie haben aber versäumt, eine größere Anzahl von Pflanzenarten und vor allem verschiedene Reizstoffe zu verwenden. Versuche mit Membranen, durch die eine Lösung diffundierte, lieferten bei längerer Dauer (3 Wochen!) bei Raphanus sativus, aber nur bei diesem, einigermaßen positive Resultate (S. 25), die aber hauptsächlich in einer Förderung des Wachstums bestanden. Sehr brauchbar erscheint die folgende Methode (S. 26), die allerdings auch kein Ergebnis hatte, aber vielleicht nur aus den schon erörterten Gründen. Es wurden an zwei entgegenge-

[1]) *Molisch,* a. a. O.

[2]) *Ewart,* Trans. of the Liverpool. Biol. Soc. Vol. 8. 1893—94. Zitiert nach *Polowzow,* Untersuchungen über Reizerscheinungen bei den Pflanzen. Jena 1911.

[3]) *Bennett,* a. a. O.

[4]) *Newcombe* and *Rhodes,* Chemotropism of roots. Botanical Gazette. Vol. 37. 1904.

setzte Flanken der in Luft wachsenden Wurzeln feuchte Fließpapierstreifen von 2 *mm* Breite durch Adhäsion befestigt. Durch die beiden Streifen, die nicht miteinander in Berührung kamen, flossen verschiedene Lösungen. Da die Wurzeln fortwuchsen, mußte von Zeit zu Zeit für Kontakt gesorgt werden.

Im Prinzip ähnlich ist die Methode von *Cholodnyi*[1], der den Wurzeln Pergamentpapierstückchen anklebte, die mit einer Suspension von $MgCO_3$ oder $Ca_3(PO_4)_2$ befeuchtet waren. Die von der Wurzel ausgeschiedene Kohlensäure löst etwas von den Salzen.

Sammet (a. a. O. S. 5) ließ eine poröse Tonzelle, die mit der Lösung des Reizstoffes gefüllt war, ins Wasser tauchen. Die Wurzeln wurden ringsherum gruppiert. Er hat auch durch Entnahme von Flüssigkeit in verschiedenen Entfernungen und Titration die Schnelligkeit der Ausbreitung geprüft (S. 6/7). Schwer lösliche Stoffe, wie Gips, konnten ohne weiteres ins Wasser eingehängt werden.

Wurzeln in festen Medien.

Um gröbere Strömungen so weit als möglich zu verhindern, läßt man die Wurzeln anstatt in Wasser in feuchten Substraten wachsen. Als solche sind Gelatine und Agar, Sand und Erde verwendet worden. Die Gelatinemethode wurde von *Newcombe* und *Rhodes* (a. a. O. S. 27) zuerst angewendet, später von *Lilienfeld*[2]) verbessert. Es wurden je zwei aus der Gallerte hergestellte Blöcke verwendet, von denen einer den Reizstoff enthielt. Die beiden Stücke wurden aneinandergeschoben, nachdem die Wurzeln dazwischen gebracht worden waren. Oder es wurde in die Gelatine eine Vertiefung gemacht, in die eine Lösung gegossen wurde, während die Wurzeln darum herum in Löcher gepflanzt wurden.

An Stelle von Gelatine hat dann *Porodko*[3]) Agar-Agar verwendet. Dieser hat den Vorzug, von Bakterien nicht verflüssigt zu werden und ihnen überhaupt nur beschränkte Vermehrung zu gestatten. Ein anhaltender Diffusionsstrom wurde dadurch erzielt, daß der Agar als dicke Scheidewand in einem länglichen Gefäß untergebracht wurde, was sich durch nachträgliche Entfernung der seitlichen Massen bewirken ließ, und daß dann auf einer Seite Wasser, auf der anderen eine Lösung dauernd vorbeiströmte (Fig. 276). Um dem schlecht haftenden Agar mehr Halt zu geben, wurden gebogene Glasstäbe verwendet, wie die Figur zeigt. Die Wurzeln ließen sich leicht in vorgebohrte Löcher einschieben. Obgleich sie in der verwendeten Agarmasse von 1·25% ohne chemotropische Reize besser gerade wuchsen als in Wasser, waren die Resultate nicht sehr einheitlich, immerhin aber gleichförmiger als bei der Mehrzahl der anderen Autoren.

---

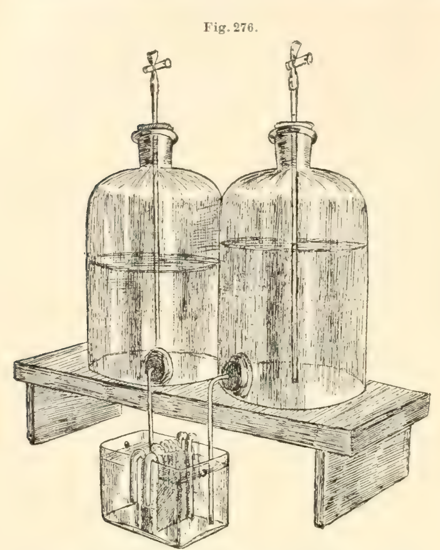
[1]) *Cholodnyi*, zitiert nach *Porodko*, Über den Chemotropismus der Pflanzenwurzeln. Jahrb. für wissenschaftl. Botanik. 1911. Bd. **49**. S. 321.

[2]) *Lilienfeld*, Über den Chemotropismus der Wurzel. Beihefte zum botan. Zentralblatt. Bd. **19**. I. Abt. 1906.

[3]) *Porodko*, a. a. O., S. 324 ff.

In den Versuchen mit Sand hat *Lilienfeld* (a. a. O.) diesen neben Gelatine angeordnet und die Diffusion zwischen beiden Medien vor sich gehen lassen. Diese Methode ist aber für einigermaßen exakte Versuche kaum zu brauchen.

Fig. 276.



Apparat zum Studium des Wurzelchemotropismus. Die Keimlingswurzeln befinden sich in der Agarscheidewand, die durch gebogene Glasröhrchen gestützt wird. (Nach *Porodko*, Jahrb. f. wissensch. Botanik, 1911, Bd. 49.)

Pflanzenstengel und Pilzfruchtträger.

Mit Pflanzenstengeln und Pilzfruchtträgern hat *W. Polowzow*[1]) eingehende Versuche angestellt. Sie hat dafür eine Methodik ausgearbeitet, die auch für andere in Luft wachsende Objekte gut brauchbar wäre. Die geprüften gasförmigen Stoffe läßt sie durch ein poröses Tonröhrchen diffundieren, das dem Pflanzenteile an einer bestimmten Stelle genähert wird. Das Röhrchen ist mit Hilfe von Gummischläuchen an eine Leitung angeschlossen, durch die dauernd ein schwacher Strom des Gases streicht. Pflanze und Diffusionsröhrchen befinden sich unter einer großen Glasglocke, deren Atmosphäre zur Entfernung des Reizgases unten mit der Außenluft in Verbindung steht.

Die kleine Menge des diffundierenden Gases hat die Verf. mit einem besonderen Apparate gemessen (S. 48ff.). Sie war um so größer, je schneller der Gasstrom war.

Eine intermittierende Reizung wurde dadurch bewirkt, daß regelmäßig fallende Quecksilbertropfen kleine Mengen Gas in einem Kapillarrohr zwischen sich einschlossen. Die entstehende *Jamin*sche Kette von Gasblasen und Quecksilbersäulchen wurde durch ein Tonrohr geleitet, durch dessen Poren das Gas ohne Rest austrat und auf die daneben befindliche Pflanze periodisch einwirkte (a. a. O. S. 175).

Pilzfäden.

Für den Chemotropismus der Pilzfäden gilt dasselbe wie für den der Wurzeln: viele Methoden und wenig gesicherte Resultate. Bei Sapro-

[1]) *W. Polowzow*, Untersuchungen über Reizerscheinungen bei den Pflanzen. Jena 1911. S. 44ff.

legnien konnte z. B. *Stange*[1]) wie bei Wurzeln eine vermehrte lokale Verzweigung in der Zone eines Reizstoffes konstatieren, aber keine Richtungsbeeinflussung. *Miyoshi*[2]) dagegen gibt eine Reihe fein ausgearbeiteter Versuchsanstellungen an, mit deren Hilfe es ihm gelang, gute Resultate zu erzielen. Neben weniger günstigen Experimenten mit der *Pfeffer*schen Kapillarmethode hat er sich hauptsächlich durchlochter Membranen bedient, durch deren Öffnungen die Reizstoffe diffundierten. Es dienten diesem Zwecke mit Spaltöffnungen versehene Epidermen verschiedener Pflanzenteile oder künstlich mit Hilfe einer sehr feinen Nadelspitze durchbohrte Collodiumhäutchen und Glimmerblättchen.

Um die Epidermen nutzbar zu machen, wurden Blätter, hauptsächlich von Tradescantia discolor, mit der zu untersuchenden Lösung unter der Luftpumpenglocke injiziert, bis sie durch Erfüllung der Interzellularräume durchscheinend aussahen. Dann wurden sie mit Wasser abgespült, mit Fließpapier getrocknet und nach Aufstäuben der Pilzsporen im dampfgesättigten Raume aufbewahrt. Bleibt nach der Keimung die Reizwirkung aus, so kann durch erneutes Abspülen wieder ein Konzentrationsgefälle geschaffen werden.

Die Epidermen der oberen (inneren) Seite von Zwiebelblättern, die sich leicht abziehen lassen, die Glimmerblättchen und Collodiumhäute wurden entweder auf Gelatinegallerte gelegt, die mit dem Reizstoffe angemacht war, oder einseitig auf eine Lösung gelegt, wobei durch Unterstützung dafür gesorgt war, daß nur die untere Seite benetzt wurde. Die Collodiumhäutchen wurden durch spurenweisen Zusatz von Mandelöl geschmeidig erhalten. Bei Glimmerblättchen mußte wegen mangelnder Saugfähigkeit auf der Oberfläche etwas Wasser adhärieren. Durch sehr verdünnte Zuckerlösung wird Keimung und Wachstum gefördert.

Die zerstreute Aussaat geschah mit Hilfe eines Pinsels, die Untersuchung unter dem Mikroskop.

Für Versuche, bei denen es auf genau bekannte Konzentration des Reizstoffes auf beiden Seiten des pflanzlichen Objektes ankam, wurde ein durchlochtes Collodiumhäutchen mit Sporen besät. Dann wurde es zwischen zwei sich kreuzende Fließpapierstreifen gelegt, durch die ein beständiger, langsamer Strom verschiedener Lösungen floß. Erreicht wurde das durch heberartige Anordnung der Papierstreifen.

Spätere Untersucher, von denen manche ihre Erfahrungen nicht veröffentlicht haben, konnten *Miyoshis* Befunde nicht wieder erhalten. Obgleich an ihrer Richtigkeit wohl nicht zu zweifeln ist, harren sie noch der Bestätigung. Die erfolglos gebliebenen Methoden zu beschreiben hat wenig Wert.[3,4])

[1]) *Stange*, Über chemotaktische Reizbewegungen. Botan. Ztg. 1890. Bd. 48. S. 140 und 141.

[2]) *Miyoshi*, Über Chemotropismus der Pilze. Botan. Ztg. 1894. Bd. 52.

[3]) Vgl. *Fulton*, Chemotropism of Fungi. Botanical Gazette. Vol. 41. 1906.

[4]) *Clark*, On the toxic properties of some copper compounds with special reference to Bordeaux mixture. Botanical Gazette. Vol. 33. 1902.

Pollenschläuche.

Für die Pollenschläuche liegen die Verhältnisse günstiger. *Molisch*[1]) und *Correns*[2]) fanden, daß auskeimende Pollenkörner ihre Schläuche vorzugsweise nach einem gleichzeitig im Präparat befindlichen Narbenfragment hinschicken. *Miyoshi*[3]) hat die geschilderten, für Pilzhyphen ausgearbeiteten Methoden auch diesem Zweck dienstbar gemacht. Es ist dabei nur zu berücksichtigen, daß viele Arten von Blütenstaub in bloßem Wasser nicht keimen. Der die Keimung ermöglichende Zucker stellt gleichzeitig das Reizmittel dar.

Lidforss[4]) konnte mit *Miyoshis* Methoden nichts erreichen. Als er aber gallertige Substrate verwendete, hatte er mehr Erfolg. Er ließ die Pollenkörner in einem Agar- oder Gelatinetropfen keimen, in dessen Mitte eine Glasperle eingesenkt war. Nach einiger Zeit wurde die Glasperle entfernt und der dadurch entstandene Hohlraum mit der Lösung des Reizstoffes gefüllt. Handelte es sich um schwer lösliche und langsam diffundierende Substanzen, wie Eiweißkörper, so konnte einfach ein Partikelchen davon auf das gallertige Substrat gebracht werden. Am besten eignete sich als solches Rohrzuckeragar von einer, der jeweiligen Pflanzenart angepaßten Zuckerkonzentration. Angaben über geeignete Objekte und die jeweils günstige Zuckerkonzentration finden sich zahlreich in der *Lidforss*schen Arbeit.

Diese Methoden sind wohl einer Ausdehnung auf andere, auf Agar wachsende oder übertragbare Organismen fähig. Ihr Vorzug besteht darin, daß in den Gallerten die Diffusion ungestört durch Strömungen zur Geltung kommt.

Myxomycetenplasmodien.

Um Myxomycetenplasmodien auf ihre chemische Reizbarkeit zu prüfen, brachte sie *Stahl*[5]) auf feuchtem Fließpapier an die senkrechte Innenseite von Glasgefäßen. In diese wurde dann die zu prüfende Lösung gegossen, so daß sie den Rand des Papieres berührte. Oder er legte auf nassem Fließpapier ausgebreitete Plasmodien auf Glasplatten und brachte Kriställchen der Reizstoffe in die Nähe des Randes, der sich im Fortschreiten befand. In beiden Fällen wurden die Objekte dunkel und feucht gehalten. *Stange*[6]) brachte kleine Mengen des Schleimpilzes auf Objektträger in dünne Wasserschichten oder auf nasses Papier und näherte ihnen mit der

---

[1]) *Molisch,* Über die Ursachen der Wachstumsrichtungen von Pollenschläuchen. Österreich. botan. Zeitschrift. Bd. **39**. 1889. S. 120.

[2]) *Correns,* Kulturversuche mit den Pollen von Primula acaulis. Ber. d. deutschen bot. Ges. Bd. **7**. 1889. S. 265.

[3]) *Miyosky,* a. a. O. S. 24 und Flora. Bd. **78**. 1894. S. 76.

[4]) *Lidforss,* Untersuchungen über die Reizbewegungen der Pollenschläuche. Zeitschrift f. Botanik. Bd. **1**. 1909. S. 446.

[5]) *Stahl,* Zur Biologie der Myxomyceten. Botan. Zeitung. Bd. **42**. 1884. S. 156.

[6]) *Stange,* Über chemotaktische Reizbewegungen. Botan. Ztg. 1890. Bd. **48**. S. 161.

Reizlösung gefüllte Kapillaren. In anderen Versuchen[1] legte er Fließpapierstreifen so über den Rand zweier Bechergläser, daß sie auf beiden Seiten in eine gleich hohe Flüssigkeitsschicht eintauchten. Waren etwaige Strömungen ausgeglichen, so wurden die Plasmodien auf den Papierstreifen aufgesetzt, und zwar oben, am Rande der Bechergläser. Die Versuche wurden unter eine Glocke ins Dunkel gestellt.

Diese Methode dürfte sehr brauchbar sein und Fehlerquellen nach Möglichkeit ausschließen. Auch gestattet sie eine regelmäßige, ungestörte Diffusion.

III. Chemonastie.

Neben den Richtungsbewegungen auf chemische Reize kennen wir auch sogenannte chemonastische Bewegungen an Pflanzen. Bei ihnen ist die Richtung der Reaktion durch den physiologischen Bau festgelegt. Sie finden sich an allerlei Objekten, besonders an solchen, die ausgeprägte mechanische Reizbarkeit besitzen, spielen aber eine größere Rolle offenbar nur bei den Insektivoren, die Bewegungen beim Tierfang ausführen.

Diese Pflanzen, nämlich Drosera, Dionaea und Pinguicula, sind alle auch mechanisch reizbar. Der Reizstoff muß deshalb in einer Form geboten werden, die Erschütterung resp. Reibung ausschließt.

Drosera wird durch die leiseste Reibung fester Körper gereizt, nicht aber durch flüssige, auch bei stärkstem Anprall.[2] Man muß daher, um chemische Einflüsse von mechanischen zu unterscheiden, die Reizstoffe in flüssiger oder gelöster Form als kleine Tröpfchen auf die Blätter bringen. Destilliertes Wasser reizt nicht.[3] Für Pinguicula gilt ähnliches. Bei Dionaea sind auf der Blattfläche besonders empfindliche Borsten vorhanden, die bei dem Aufbringen der Versuchsflüssigkeit nicht berührt werden dürfen, da jede Erschütterung ein Schließen des Blattes bewirkt. Auch ist die durch bloße chemische Reizung hervorgerufene Reaktion sehr viel langsamer, wenn auch andauernder als die durch mechanische Einflüsse bewirkte. Bei der im Wasser wachsenden Aldrovanda ist eine chemische Reizbarkeit meines Wissens bisher nicht konstatiert.

Bei den übrigen bekannten Fällen von Chemonastie handelt es sich meist um die Einwirkung gasförmiger Stoffe, für die eine besondere Technik nicht ausgebildet wurde. Höchstens bei den flüchtigen Narkoticis konnte man von einer solchen sprechen, indem meist in einer abgeschlossenen Atmosphäre durch Einbringen größerer Mengen einer wässerigen Lösung von Chloroform oder Äther ein Gleichgewicht zwischen der Tension des Narkotikums in Wasser und Luft geschaffen wird. Die Stärke der Einwirkung hängt bei nicht zu großem Verhältnis von Luftvolumen und Flüssigkeitsmenge allein von der Konzentration der Lösung ab. Nicht

---

[1]) a. a. O. S. 164.

[2]) *Ch. Darwin,* Insektenfressende Pflanzen. Übers. von *J. V. Carus.* 2. Aufl. Stuttgart 1899. S. 31.

[3]) a. a. O. S. 68.

leicht ist es, äther- und chloroformdichte Verschlüsse zu bewirken, denn weder Kautschuk, noch Fett, Vaseline etc. sind unlöslich in, und demnach undurchlässig für die genannten Stoffe. Falls diese Verschlußmittel nicht zu umgehen sind, muß ihre absorbierende Oberfläche möglichst klein gewählt werden. Auch ist die Absorption des Narkotikums durch etwa gebotenes Wasser, besonders aber durch Erde und dergleichen, sowie auch durch den Zellsaft der Pflanze zu bedenken, wenn eine bestimmte Tension erzielt werden soll.

IV. Beeinflussung der Sekretionstätigkeit durch chemische Reize.

Viel weniger als über die Bewegungserscheinungen wissen wir über die sonstigen Veränderungen, die in der Pflanze durch äußere Anlässe, wie z. B. chemische Reize stattfinden. Sie sind hauptsächlich chemischer Natur. Unter ihnen sind am leichtesten diejenigen Vorgänge kenntlich, die sich ohne weiters äußerlich beobachten lassen, wie z. B. die Sekretionstätigkeit der Drüsen. Bei den hoch spezialisierten Insektivoren vor allem findet vielfach erst dann eine Absonderung der Verdauungsenzyme statt, wenn Bedarf daran ist, d. h. wenn ein Insekt gefangen worden ist. So verhält es sich bei Pinguicula, wo ein Sekret zwar auch durch stickstofffreie Substanzen, wie Rohrzucker, hervorgerufen werden kann, aber erst auf Reizung mit Fleisch und dergleichen die sauren und peptonisierenden Eigenschaften erhält.[1]) Ähnlich verhält sich Drosera rotundifolia, während andere Arten auch ohne Reizung saures wirksames Sekret absondern.[2]) Dionaea beginnt überhaupt erst auf einen chemischen Reiz hin zu sezernieren, also eine Pepsin und Säure enthaltende Flüssigkeit auszuscheiden. Bei Nepenthes findet sich das Enzym in der Kannenflüssigkeit stets vor. Sauer wird die Lösung aber erst durch chemische Reize.[3]) Bei Sarrazenia, Darlingtonia und Cephalotus konnte *Goebel*[4]) kein Enzym finden. Die Auflösung der gefangenen Tiere soll durch Bakterien vor sich gehen. Bei Utrikularia ist in den Bläschen während der Verdauung ein Enzym nachzuweisen, das bei alkalischer Reaktion arbeitet.[5]) In allen Fällen, wo Enzyme ausgeschieden werden, ist auch durch Absonderung bakterizider Stoffe für ein Fernhalten von Fäulniserregern gesorgt. Die Bedingungen für die Sekretion der verschiedenen Stoffe, deren Natur und die Aufsaugung der gelösten Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung und sonstigen Einflüssen wären eines weiteren Studiums auf chemischer Grundlage sehr würdig. Die Technik dazu wird teilweise erst noch geschaffen werden müssen.

Es wird sich hauptsächlich darum handeln, chemisch bestimmt charakterisierte Reizstoffe zu verwenden und sie auf ihre Wirksamkeit zu unter-

---

[1]) *Goebel*, Pflanzenbiologische Schilderungen. Marburg 1889. S. 185.

[2]) Ebenda. S. 197.

[3]) *Goebel*, a. a. O. S. 189.

[4]) *Goebel*, a. a. O. S. 87 u. 170.

[5]) *v. Luetzelburg*, Beiträge zur Kenntnis der Utrikularien. Flora. 1910. Bd. **100**. S. 146 ff.

suchen, auch zuzusehen, ob ein dem Nahrungsstoff der Art nach angepaßtes Sekret abgeschieden wird. Die hierfür brauchbaren allgemeinen Methoden der Enzymforschung findet man im dritten Bande dieses Handbuches.

V. Die Beschaffung geeigneter Objekte.

Bakterien werden nach den bekannten Methoden[1] reingezüchtet und kultiviert. Viele Arten, die gut beweglich und chemotaktisch reizbar sind, lassen sich schwer isolieren oder werden in der Kultur schlecht beweglich und verlieren ihre Reizbarkeit. Alte Laboratoriumsstämme, die oft von einem festen Nährboden auf den anderen geimpft worden sind, verlieren manchmal die für chemotaktische Versuche günstigen Eigenschaften.[2] Man wird daher vielfach gut tun, frisch isolierte Kulturen zu verwenden und sie abwechselnd auf festen und flüssigen Substraten zu kultivieren. Ersteres um die Reinheit zu prüfen, letzteres um die Beweglichkeit zu erhalten. Für die Versuche empfiehlt es sich, von Agarkulturen Material zu entnehmen und dieses in Wasser zu übertragen, um nicht zu viel gelöste Stoffe in der Flüssigkeit zu haben, die die Empfindlichkeit zu vermindern vermögen. Andrerseits leidet in reinem Wasser wieder die Beweglichkeit. Manche Bakterienarten scheinen auch nach langer Kultur nichts von ihrer Eignung für Versuche einzubüßen.

Als gut chemotaktisch erweisen sich besonders die eigentlichen Fäulnisbakterien, so z. B. „Bacterium termo“ und Spirillen. Die ersteren erhält man durch ein- bis zweitägiges Faulenlassen von gekochten Erbsen in Wasser und isoliert sie durch Plattenguß. Spirillen treten besonders in späteren Stadien der Zersetzung auf, und zwar vorzugsweise in tieferen Schichten der Lösung. Sie sind meist schwer rein zu züchten. Eine Ausnahme macht das schon S. 1279 erwähnte Spirillum rubrum Esmarch. Auch wenn man Stückchen von Fleisch, Schnecken etc. in Teich-, Fluß-, Sumpfwasser bringt, kann man auf eine üppige Flora geeigneter Objekte rechnen. Weniger reizbar sind meist die pathogenen Formen.[3]

Von den Schwierigkeiten, die durch Einstellung der Beweglichkeit und Veränderungen in der Reizbarkeit auftreten, findet sich eine Zusammenstellung bei *H. Pringsheim*, Die Variabilität niederer Organismen. Berlin 1910. S. 41 ff. u. 51 ff.

Saprolegnien entwickeln sich leicht auf Insektenleichen in Sumpfwasser. Die mit schleimigen Flöckchen bedeckten Fliegen etc. bringt man mit der Pinzette auf schräg liegende Objektträger, über die man einen Strom Wasser leitet, um die Hauptmasse der fremden Organismen zu ent-

[1]) Vgl. Bd. 3. S. 1204 ff.

[2]) *Kniep,* Untersuchungen über die Chemotaxis von Bakterien. Jahrb. f. wissenschaftliche Bot. Bd. 43. 1906. S. 220.

[3]) *Pfeffer,* Über chemotaktische Bewegungen von Bakterien, Flagellaten und Volvocineen. Untersuch. aus dem botan. Institut zu Tübingen. Bd. 2. 1886–88. S. 590 ff. und S. 615.

fernen, wobei mit einem weichen Pinsel nachgeholfen wird. Dann überträgt man sie in sterilisiertes Sumpfwasser, dem einige sterilisierte Fliegenbeine zugesetzt sind. Auf diesen entwickeln sich die Pilze und entlassen ihre Zoosporen.[1]) Zu beachten ist noch, daß bei den Arten von Saprolegnia zwei Schwärmstadien auftreten, von denen nur das zweite chemotaktisch ist.

Die Spermatozoen von Lebermoosen[2]) und Laubmoosen[2]) werden aus den reifen Antheridien entleert, wenn diese in einen Tropfen Wasser gebracht werden. Ebenso entlassen die an den kleinen Vorkeimen der Pteridophyten entwickelten Antheridien ihre Samenfäden. In allen diesen Fällen hält man die Pflänzchen zweckmäßig vorher etwas trocken. Die Prothallien der Farne, Schachtelhalme etc. sind meist auf Sand oder Torf unschwer aus der Spore zu kultivieren. Man entnimmt zum Versuche ein ganzes, möglichst unverletztes Prothallium und spült es gut ab, um etwa herausdiffundierende Stoffe zu entfernen. Dann bringt man es in einen Tropfen Wasser auf den Objektträger, wo die Spermatozoen alsbald auszuschwärmen beginnen. Die Kapillaren werden dann hinzugeschoben. Kleine Prothallien sind vorzuziehen, weil größere schwer unterzubringen sind und beim Zerschneiden zu viele Inhaltsstoffe entlassen würden.[3])

Schwärmsporen von Myxomyceten erhält man durch Aussäen der Sporen in Wasser[4]), eventuell unter Zusatz von Säure, z. B. $^{1}/_{1200}$ Mol. H_2SO_4.[5]) Plasmodien gewinnt man aus Gerberlohe oder man sammelt die nach einem Regen an die Oberfläche kommenden Schleimpilze im Walde.

Über die Gewinnung von Flagellaten, Volvocineen etc. vgl. die zitierten Arbeiten von *Pfeffer*. *Jakobsen*[6]) konnte aus Erde mit Fibrin in Wasser allerlei Volvocineen herauszüchten. Nach eigenen Erfahrungen haben diese Organismen das beste Bewegungs- und Reaktionsvermögen, wenn sie auf feuchten Substraten, wie Agar, Sand, Gips, Torf in unbeweglicher oder „Palmellen"-Form kultiviert und dann durch Übertragen in Wasser in das schwärmfähige Stadium gebracht werden.

---

[1]) *Stange*, Über chemotaktische Reizbewegungen. Bot. Ztg. Bd. **48**. 1890. S. 109.

[2]) *Pfeffer*, Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. Untersuchungen aus dem botan. Institut zu Tübingen. Bd. **1**. 1881—85, S. 430 u. 434.

[3]) Über die Behandlung des Materials vgl. ferner: für Farne *Pfeffer*, Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. Untersuch. aus dem botanischen Institut zu Tübingen. Bd. **1**. 1881—85. S. 368, für Salvinia *Shibata*, Studien über die Chemotaxis der Salviniaspermatozoën. Bot. Magaz. Tokyo. Vol. **19**. 1905. p. 39, für Equisetum *Shibata*, Über die Chemotaxis der Spermatozoën von Equisetum. Ebenda. S. 79 und *Lidforss*, Über die Chemotaxis der Equisetum-Spermatozoïden. Berichte der deutsch. bot. Ges. Bd. **23**. 1905. S. 314, für Lycopodium *Bruchmann*, Von der Chemotaxis der Lycopodium-Spermatozoïden. Flora. Bd. **99**. 1909. S. 193, für Isoëtes *Shibata*, Studien über die Chemotaxis der Isoëtes-Spermatozoïden. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. **41**. 1905. S. 561.

[4]) *Kusano*, Studies on the chemotactic and other related reactions of the swarmspores of Myxomycetes. Journal of the College of Agriculture. Imp. Univ. of Tokyo. Vol. 2. 1909. S. 4.

[5]) a. a. O. S. 8.

[6]) *Jakobsen*, Kulturversuche mit einigen niederen Volvocaceen. Zeitschr. f. Botanik. Bd. 2. 1910. S. 145.

Zur Kultur von Infusorien ist eine Entwicklung von Bakterien notwendig. Man verwendet für Paramaecien Wasser, in das etwas Heu und Weißbrot getan wird, sonst auch getrocknete Salatblätter und andere Pflanzenteile. In anderen Fällen Jauche, Mistabkochung u. dgl.[1])

Allerlei Pilze fängt man z. B. aus der Luft auf Agar mit Pflaumensaft oder man gewinnt sie von Pferdemist, der unter einer Glocke feucht gestellt wird.[2])

Pollenschläuche wachsen aus frischem Blütenstaub nach wenigen Minuten bis einigen Stunden in Wasser oder Zuckerlösung geeigneter Konzentration aus. Der richtige osmotische Druck der Lösung muß ausgeprobt werden, wobei man bis zu 40% Rohrzucker gehen möge.[3])

Um Reizversuche an Wurzeln anzustellen, ist es nötig, tadellos gerade gewachsenes Material zu verwenden. Die Vorbehandlung der Samen ist ähnlich wie oben für Wasserkulturen angegeben (vgl. S. 1266). Meist tut man die angequollenen Samen in ein Keimbett von lockeren, sparsam, aber gleichmäßig befeuchteten Sägespänen von Fichten- oder Pappelholz. Solche von Kiefern oder Eichen sind unbrauchbar. In dieses Substrat bohrt man mit einem Hölzchen oder dgl. senkrechte Löcher, in die die Wurzeln ohne mechanischen Widerstand gerade hinunterwachsen können.

Giltay[4]) verwendet an Stelle der Sägespäne feuchten Sand. Dieser wird in rechteckige Tongefäße bis zum Rande eingefüllt. Die gequollenen Samen werden in die Oberfläche des Sandes halb eingedrückt, und zwar so, daß das Würzelchen beim Aufrechtstellen der Kästen der nun schwach gegen die Vertikale geneigten Sandfläche außen entlang wächst. Um Austrocknung zu verhindern, ist Bedeckung der offenen Seite notwendig. Außerdem kann die untere Kante des Tongefäßes in Wasser stehen. Die Methode gestattet eine leichte Beaufsichtigung der Keimung und Entnahme der geeigneten Pflänzchen ohne Störung der übrigen.

Zu den Versuchen werden die Keimlinge vorsichtig aus dem Keimbett genommen, wenn sie 1—3 *cm* lang sind. Dann werden sie in Wasser getan und dabei etwas abgespült, sowie gleichzeitig reichlich mit Wasser getränkt. Für Versuche in Luft umhüllt man die Samen resp. Kotyledonen mit feuchter Watte, Leinwand oder Papier. Auch die oberen Teile der Wurzeln werden zweckmäßig mit feuchtem Seidenpapier umwickelt, um der Wurzel Gelegenheit zur Wasseraufnahme zu bieten, die zum Wachstum nötig ist. (Vgl. z. B. *Sammet*, a. a. O. S. 14.) Die Befestigung kann an den Kotyledonen oder dem Endosperm mit Hilfe durchgesteckter Nadeln geschehen oder die Wurzeln werden in Löcher von Korkplatten gesteckt.

---

[1]) Vgl. auch *Pütter*, Methoden zur Erforschung des Lebens der Protisten. Handbuch d. physiol. Methodik, herausgegeben von *R. Tigerstedt*. Bd. 1. S. 1. Leipzig 1908.

[2]) Vgl. auch *Küster*, Kultur der Mikroorganismen. Leipzig-Berlin 1907.

[3]) *Lidforss*, Untersuchungen über die Reizbewegungen der Pollenschläuche. Zeitschrift f. Botanik. Bd. 1. 1909. S. 448.

[4]) *Giltay*, Einige Betrachtungen und Versuche über Grundfragen beim Geotropismus der Wurzel. Zeitschr. f. Botanik. Bd. 2. 1910. S. 318.

Stets ist darauf zu achten, daß die Versuchsobjekte einige Zeit (1 bis 2 Stunden) im Apparat sind, bevor der eigentliche Versuch beginnt. Dadurch haben sie die Möglichkeit, etwa bei der Vorbehandlung induzierte geotropische Krümmungen auszugleichen. Ferner hat man während dieser Zeit Gelegenheit, sich davon zu überzeugen, ob Wachstum stattfindet.

Besonders beliebt sind die schnell keimenden und großen Samen der Leguminosen, wie Vicia Faba, Phaseolus multiflorus, Lupinus albus und Pisum sativum. Von kleineren Vicia sativa und Ervum Lens. Doch ist zu berücksichtigen, daß Bohnen und Lupinen leicht faulen. Sie dürfen deshalb nicht eingeweicht und überhaupt nicht zu naß gehalten werden. Ferner sind geeignete Objekte die Keimwurzeln von Zea Mays, Helianthus annuus, Ipomoeaarten, Fagopyrum esculentum, Brassicaarten, Sinapis alba u. a.

Gewöhnlich sind die bei der Keimung zunächst auftretenden Hauptwurzeln allein geprüft worden, doch ist gerade bei den Nebenwurzeln erster und zweiter Ordnung vielleicht ein besseres Resultat zu erwarten, da bei diesen der Geotropismus als Orientierungsfaktor zurücktritt. Freilich ist das Arbeiten mit ihnen schwieriger.

Über die Beschaffung geeigneter Pflanzen für die sonstigen Reizversuche können hier keine genügenden Angaben gemacht werden. Die Mehrzahl der Insektivoren wird nur in einem geregelten gärtnerischen Betriebe mit Gewächshaus zweckmäßig zu ziehen sein. Doch stehen Drosera und Pinguicula in Torfmooren wild zur Verfügung und halten sich, in Torferde mit Regenwasser begossen und hell gehalten, recht gut. Kalk ist ihnen schädlich.

Die quantitative Mikroelementaranalyse organischer Substanzen.[1]

Von **Fritz Pregl**, Innsbruck.

Eigene Erfahrung an einem nur in außerordentlich geringer Ausbeutung erhältlichen Körper ließ es mich besonders schmerzlich empfinden, daß jede zum Zwecke der organischen Elementaranalyse angewandte Substanzmenge für weitere Versuche unwiederbringlich verloren ist und machte in mir den Wunsch rege, nach Methoden zu fahnden, welche bei sonst gleicher Genauigkeit mit geringen Substanzmengen ihr Auslangen finden und womöglich mit den allereinfachsten Mitteln auszuführen sind. Ermutigend wirkten von vornherein in dieser Richtung die glänzenden Versuchsergebnisse *Emichs*[2]) und seiner Schüler auf dem Gebiete der Mikroanalyse mit Hilfe der Mikrowage von *Nernst*.

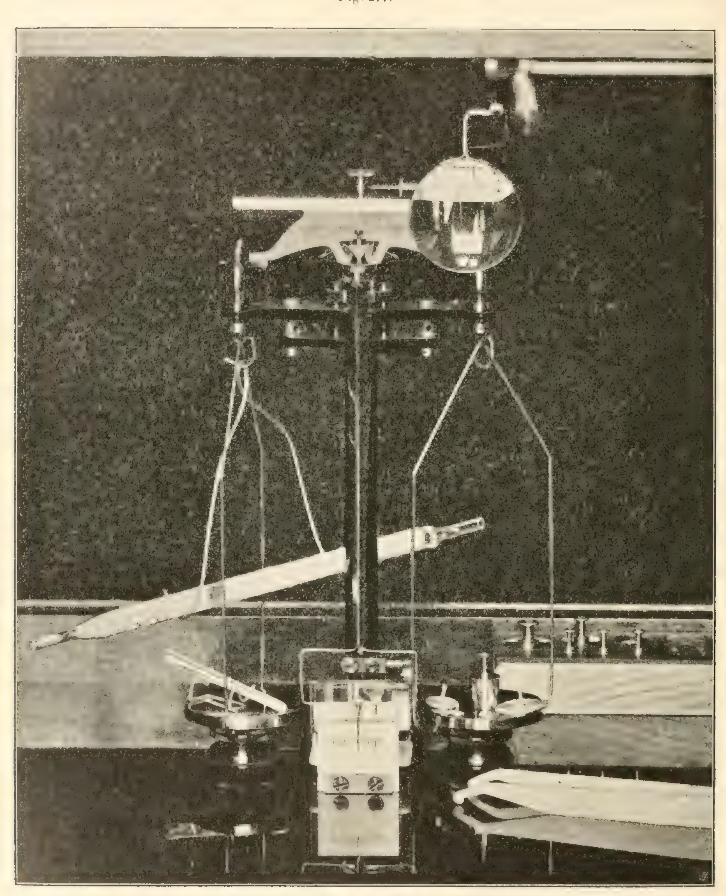
Von der Anwendung letzterer habe ich von allem Anfange an aus dem Grunde absehen müssen, weil ihr Wägungsbereich und ihre Tragkraft im Vergleiche zum Gewichte noch so kleiner Absorptionsapparate etc. mir zu gering erschienen. Alle im Nachstehenden mitzuteilenden Methoden sind mit einer aus der Präzisionswerkstätte von *Wilh. H. F. Kuhlmann* in Hamburg-Barmbeck (Steilshoperstraße Nr. 103) hervorgegangenen Wage (Fig. 277) ausgeführt und ich möchte von diesem ausgezeichneten Instrument (Nr. 19b des Kataloges, Preis samt Gewichtssatz zirka 270 Mark) an dieser Stelle nur hervorheben, daß es bis zu einer Maximalbelastung von 20 *g* gleichbleibende Empfindlichkeit hat, infolge einer Balkenlänge von nur 70 *mm* außerordentlich rasch schwingt, daß der Reiter infolge der maschinell hergestellten hundert Einkerbungen an jeder Stelle des Reiterlineals stets den gleichen Sitz einnehmen muß, daß eine mit der Reiterverschiebung mitfahrende Lupe eine bequeme Ablesung trotz Kleinheit des Balkens gestattet und daß die Schwingungen der Zunge durch einen vergrößernden Hohlspiegel beobachtet werden. Die Empfindlichkeit dieser Wage ist so eingestellt, daß $^1/_{10}$ *mg* eine Ausschlagsvergrößerung von 10 Teil-

[1]) Originaluntersuchungen.

[2]) Statt weitläufiger Anführungen der Originalliteratur sei es mir hier gestattet, nur auf das jüngst erschienene „Lehrbuch der Mikrochemie" von *Friedrich Emich*, Wiesbaden 1911, Verlag von J. F. Bergmann, zu verweisen, in welchem die gesamte bisherige Literatur dieses Gebietes berücksichtigt ist.

strichen nach der entgegengesetzten Seite bedingt und daß demnach ein Ausschlagsunterschied von einem Teilstrich $^1/_{100}$ *mg* entspricht. Durch

Fig. 277.



Mikrochemische Wage von *Kuhlmann* (Hamburg).
($^3/_5$ der nat. Größe.)

Schätzung von Bruchteilen bei Beobachtung einer Reihe von Umkehrpunkten wird es mit diesem Instrument sogar möglich, Wägungen mit einer Genauigkeit von $\pm$ $^1/_{1000}$ *mg* auszuführen.

Zum Zwecke des bequemeren und sicheren Arbeitens ist es notwendig, diese Wage auf einer Marmorplatte aufzustellen, die auf in eine Grundmauer eingelassenen Eisenträgern fest aufliegt. Die Gewichte sowie die dazu gehörige Elfenbeinpinzette bewahre man am besten im Wagengehäuse in der Nähe der rechten Wageschale offen auf, während hinter der linken Wageschale die Aufhängevorrichtung für die Absorptionsapparate sowie die Bänkchen aus Magnesiumdraht (siehe beide in Fig. 277) für die Substanzwägung bei der Stickstoff-, Halogen- und Schwefelbestimmung Platz finden können. Zur weiteren Ausgestaltung des Wagetisches gehören zwei Gazeläppchen, sorgfältig gewaschen und getrocknet, mindestens 4fach zusammengelegt, ein Stück Rehleder, ein Haarpinsel sowie Wägegläschen zur Unterbringung des Schiffchens bei Wägung hygroskopischer Substanzen nach der Trocknung (Fig. 285), Wägegläschen für die Stickstoffbestimmungen, Schmelzpunktkapillaren für die Halogen- und Schwefelbestimmungen, alles unter entsprechenden Glasglocken oder zwischen Uhrgläsern verwahrt, ferner Handexsikkatoren, Kupferblöcke (Fig. 287, 292, 297) usw.

Absolute Reinlichkeit des Wagetisches, insbesondere der Wage selbst, ist die erste Voraussetzung erfolgreicher Analysen. Man gewöhne sich daran, vor jeder Serie von Wägungen den Nullpunkt der Wage zu prüfen und im Bedarfsfalle neu einzustellen. Man wird es selbst bei der geschilderten Aufstellung auf einer Marmorkonsole von Zeit zu Zeit nötig haben und mag daraus ermessen, wie oft sich der Nullpunkt bei Aufstellung auf einer hölzernen Konsole oder etwa auf einem Tisch verschieben möchte! Mindestens einmal im Monat wird es auch bei der größten Sorgfalt und Reinlichkeit zu empfehlen sein, die Wage einer völligen Reinigung zu unterziehen. Man öffne die Türen, entfernt beide Schieber, demontiert die Wage durch Abnehmen der Schalen, Gehänge und des Balkens, die man zweckmäßigerweise auf einen der beiden horizontal hingelegten Schieber in richtiger Reihenfolge hineinlegt, reinigt zuerst die Grundplatte durch Reiben mit feuchter Gaze, reibt Schalen und Gehänge mit fett- und säurefrei gewaschenem und scharf getrocknetem Rehleder ab, pinselt insbesondere das gezähnte Reiterlineal am Balken sorgfältig aus, reibt sämtliche 12 Arretierungskontakte, die sich sowohl am Balken, an den Gehängen als auch an der Arretierungsvorrichtung der Säule befinden, mit trockenem Rehleder energisch ab und reinigt zum Schluß ebenfalls mit Rehleder die Schneiden und die ihnen entsprechenden Auflagen. Nun wird die Wage wieder zusammengesetzt und der Nullpunkt mittelst der Fahne annähernd eingestellt. Es muß bemerkt werden, daß diese Wage nach einer derartig erfolgten Reinigung durch einige Stunden „krank ist", das heißt keine konstante Nullpunktlage besitzt. Erst nach einigen Stunden kann die definitive Einstellung erfolgen. Bei größerer Abweichung bedient man sich wieder der Fahne, hüte sich jedoch, sie mit den warmen Fingern zu berühren, sondern besorge die Bewegung der Schraube mit der Elfenbeinpinzette. Die letzte Feineinstellung $^1/_{200}$—$^1/_{300}$ *mg* erfolgt bei schwingender Wage mit den beiden Stellschrauben des Gehäuses.

Die kleinen Drahtgewichte werden durch Abpinseln auf reiner Gaze als Unterlage, die Grammgewichte durch sanftes Abwischen mit Rehleder gereinigt. Schließlich wird noch der dazu gehörige Holzblock ausgeblasen, ausgepinselt und abgewischt.

Aus den mehrere Tausend betragenden Wägungen, die im Laufe dieses Jahres mit dieser Wage zur Ausführung kamen, haben sich einige Erfahrungssätze ergeben, die hier angeführt zu werden verdienen.

1. Ein und dasselbe Objekt zeigt nach gleicher Behandlung und unter sonst gleichen Bedingungen stets dasselbe Gewicht selbst in der 5. Dezimale. Mein Platinschiffchen zeigte z. B. heute dasselbe Gewicht wie vor einem Jahr.

2. Das menschliche Auge ist bei halbwegs nicht ungünstigen Bedingungen (Ausnahmen sind z. B. feinste Quecksilbertröpfchen und Fettflecke) noch weit empfindlicher als diese Wage.

3. Eine für unser Auge und unser Tastgefühl tadellos erscheinende Reinigung, wie Abwischen, Abwaschen, Auskochen usw., gewährleistet bei demselben Objekt stets dasselbe Gewicht bei sonst gleichen Bedingungen selbst in der 5. Dezimale, falls damit nicht tiefergreifende stoffliche Veränderungen an dem Objekte hervorgerufen werden.

Diese Erfahrungssätze sind durch Wägungen gewonnen, bei denen das Gewicht den Wert von 6 Grammen nicht überstiegen hat; damit ist aber die Richtigkeit der grundsätzlichen Voraussetzungen für die Ausführbarkeit der mitzuteilenden Methoden bewiesen, denn in keinem Falle werden dabei schwerere Objekte zur Wägung kommen.

4. Viele Einflüsse, denen man bei dem älteren Verfahren eine besondere Beachtung stets schenken mußte, wie z. B. der Einfluß der Temperatur, die Aufnahme von Feuchtigkeit etc., haben sich gegen meine ursprünglichen Befürchtungen als von untergeordneter Bedeutung erwiesen, denn kleine Massen mit kleinen Oberflächen gleichen sich in bezug auf ihre Temperatur rasch mit ihrer Umgebung aus und folgen ihr auch rascher, wenn jene sich ändert.

Indem ich nun die Endergebnisse der im Nachfolgenden zu beschreibenden Untersuchungen zusammenfasse, muß ich erklären, daß das angestrebte Ziel nicht nur in bezug auf die G e n a u i g k e i t der R e s u l t a t e, sowie die E i n f a c h h e i t der e r f o r d e r l i c h e n M i t t e l und d e s V e r f a h r e n s wirklich vollkommen erreicht worden ist, sondern daß sich bei allen infolge der Kleinheit der anzuwendenden Substanzmengen eine so w e s e n t l i c h e E r s p a r n i s an Z e i t ergeben hat, daß der von mir eingeschlagene Weg für das G e s a m t g e b i e t der a n a l y t i s c h e n C h e m i e l o h n e n d und v o r t e i l h a f t sein wird, denn wie wir sehen werden, ist die Methodik für die wichtigsten Operationen und Bestimmungsarten schon ausgearbeitet, wie Filtration und Waschen von Niederschlägen, Destillation, Titration, Absorption und gasometrische Bestimmung von Dämpfen oder Gasen und endlich, wovon an anderem Orte die Rede sein soll, die mikroelektrolytische Bestimmung von Metallen.

Diese Methoden eignen sich auch sehr gut zu Vorlesungsexperimenten.[1])

Die vorliegenden Untersuchungen wurden vor fast genau einem Jahre im Grazer Institute für medizinische Chemie (Vorstand Hofrat *K. B. Hofmann*) begonnen und im Institute gleichen Faches zu Innsbruck fortgesetzt und beendet. Dabei unterstützte mich mein Assistent Herr *Max de Crinis* auf das wirksamste: ich kann es daher nicht unterlassen, auch an diesem Orte seine unbedingte Verläßlichkeit anzuerkennen und ihm für seinen Eifer meinen Dank zu sagen.

1. Die mikroanalytische Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff.

Dem ersten Versuch in dieser Richtung ging die mathematische Überlegung voraus, daß, wenn wir statt mit einer Genauigkeit von $^1/_{10}$ *mg* mit einer solchen von $^1/_{100}$ *mg* wägen, wir die Substanzmenge auch auf mindestens $^1/_{10}$ der bisher üblichen Quantität herabsetzen dürfen, um dieselbe Genauigkeit zu erreichen wie zuvor.

Wenn wir bisher rund 200 *mg* organische Substanz einer Elementaranalyse unterwerfen und wir begehen bei der Wägung des Kohlendioxyds einen Fehler von 1 *mg*, so bedingt dies im Resultat einen Fehler von 0·1—0·2% Kohlenstoff, je nach dem Kohlenstoffgehalt des untersuchten Körpers; und ein Fehler von 1 *mg* in der Wägung des Wassers wird eine noch geringere Beeinträchtigung des Resultates für den Wasserstoff bedingen. Hingegen wird ein Fehler von 1 *mg* in der Wägung der Substanz einen Fehler von 0·2—0·4% Kohlenstoff zur Folge haben. Es ergibt sich daraus, daß wir vor allem die Wägung der Substanz mit der größten Genauigkeit vorzunehmen haben und diese ist bei kleinen Mengen um so leichter zu erreichen.

Ebensowenig wie man bei dem bisherigen Verfahren mit einer der gebräuchlichen guten analytischen Wagen bei der Substanzwägung einen Fehler von 1 *mg* begeht, sondern im Gegenteil eine Genauigkeit von $^1/_{10}$ *mg* erzielt werden kann, ebensowenig wird man mit der vorher besprochenen Kuhlmannwage einem Fehler von $^1/_{10}$ *mg* ausgesetzt sein, sondern die Substanzwägung jederzeit auf $^1/_{100}$ *mg* genau zur Ausführung bringen können.

Eine weitere mathematische Überlegung hat nun ergeben, daß bei Anwendung von rund 8 *mg* organischer Substanz 0·3 *mg* CO_2 1% Kohlenstoff entsprechen, daß also 0·03 *mg* 0·1% im Kohlenstoff ausmachen und daß der übliche zulässige Fehler von 0·2% für den Kohlenstoff bei der Substanzmenge von rund 8 *mg* erst durch einen Fehler im Kohlendioxydgewicht von 0·06, also mehr als einem halben Zehntel Milligramm erreicht ist.

---

[1]) Experimentalvorträge des Verfassers: am 27. Februar 1911 in der Sitzung der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin und am 21. Juli 1911 in der Sitzung der physiologischen Gesellschaft zu Berlin.

Diese letztere Überlegung wirkte außerordentlich ermutigend, die Bedingungen aufzusuchen und festzulegen, unter denen exakte C-H-Bestimmungen an kleinen Substanzmengen ausgeführt werden können und bestimmten mich von allem Anfang an, für diese Bestimmungen die Menge von rund 10 *mg* stets in Anwendung zu bringen.

Indem ich darauf verzichte, die umständlichen Wege, die ich zuerst beschritten, und die lehrreichen anfänglichen Mißerfolge ausführlich anzuführen, will ich nun die Beschreibung der notwendigen Hilfsmittel und die zur sicheren Erreichung des angestrebten Zieles als richtig erkannten Vorschriften für die Ausführung folgen lassen.

Ein neuer Weg.

Wohl jeder, auch der kundigste Analytiker, wird auf dem Gebiete der organischen Elementaranalyse Mißerfolge zu verzeichnen haben und sofern diese nicht auf grobe Wägungs- oder andere Fehler zurückzuführen sind, sind sie meistens die Folge unvollständiger Absorption oder unvollständiger Verbrennung infolge zu raschen Ganges des Gasstromes. Daß das unvollständig Verbrannte aus den Absorptionsapparaten in solchen Fällen entweicht, ist immer behauptet worden; meines Wissens sind aber die Gase, welche die Absorptionsapparate verlassen, niemals einer besonderen Beachtung unterzogen worden. Nur 2 Beobachtungen möchte ich hier anführen. 1. Die Angabe *Dennstedts,* welcher aus der Schwärzung der an die Absorptionsapparate angeschlossenen Palladiumchlorürlösung Kohlenoxydgas bei rascher und unzweckmäßig geleiteter Verbrennung nachweist und 2. meine eigene Beobachtung, welche zeigt, daß bei rasch geleiteter Verbrennung von Gallensäuren die aus den Absorptionsapparaten austretenden Gase in konzentrierter Schwefelsäure gelben Farbenton mit grüner Fluoreszenz hervorrufen. Um die durch unvollständige Absorption oder unvollständige Verbrennung bedingten Fehlerresultate zu vermeiden, hat man bisher nur zu raten gewußt, daß man die Verbrennung langsam und gleichmäßig vorzunehmen habe. Ich schlage zur Vermeidung dieser Fehler einen, wie es mir scheint, vollkommen neuen Weg ein, der darin besteht, daß man erst die, aus den Absorptionsapparaten austretenden Gase (vorwiegend Sauerstoff, dem geringe Mengen von Unabsorbiertem oder unvollständig Verbranntem beigemengt sein können) in einem, eigens dazu angefertigten kleinen Quecksilbergasometer auffängt und nach vollendeter erster Verbrennung diese Gase noch einmal durch das glühende Verbrennungsrohr hindurchschickt. Es ist klar, daß auch für einen an sich schwer verbrennlichen Kohlenwasserstoff bei diesem zweiten Passieren durch das glühende Verbrennungsrohr die Verbrennungsbedingungen günstiger sind, als wie bei der Verbrennung der ursprünglichen Substanz; ist ja vor dem zweiten Passieren des Verbrennungsrohres das große Volumen des beigemengten indifferenten, das Gasgemenge verdünnenden Kohlendioxyds mittlerweile durch das erste Passieren des Kalirohres entfernt und dadurch die Entzündungstemperatur des übrig gebliebenen Gasrestes herabgesetzt worden.

Dieser Quecksilbergasometer (Fig. 278) stellt einen zylindrischen Hohlkörper von etwa 4 *cm* Durchmesser und 7 *cm* Länge vor. Er verjüngt sich nach oben, wo sich ein einfacher Hahn h_1 befindet, von dem aus ein rechtwinkelig, also horizontal abgebogenes, 4 *mm* im äußeren Durchmesser messendes Glasröhrchen *hgl* ansetzt. An der entgegengesetzten unteren Seite dieses Gasometergefäßes, welches etwa 75 cm^3 Fassungsraum besitzt, ist der Boden rund abgeschmolzen und zu beiden Seiten desselben, in dem auf der Richtung des oberen Röhrchens senkrecht stehenden Durchmesser, befinden sich zwei Ansätze, von denen der eine einen Glashahn h_2 trägt, der zum Auslassen des Quecksilbers dient und der andere in ein 7 *mm* im äußeren Durchmesser betragendes und 18 *cm* hohes, mit einem offenen Trichter versehenes Steigrohr *St* übergeht. Dieser Gasometer ruht auf einem gedrehten Holzgestell, welches auf einer Grundplatte aus Holz ruhend, so hoch ist, daß das früher erwähnte seitlich gebogene Röhrchen genau mit der Höhe der Absorptionsapparate und der Mitte der Verbrennungsröhre während der Verbrennung übereinstimmt. Auf der erwähnten Grundplatte aus Holz findet auch eine 100 cm^3 fassende Kristallisierschale (*Kr*) aus Glas mit ebenem Boden, zylindrischen Wänden und einem Schnabel ihren Platz, in welche der früher erwähnte Auslaufhahn des Gasometers hineinragt und die Bestimmung hat, das abgelassene Quecksilber aufzunehmen.

Fig. 278.



Quecksilbergasometer [illegible]
h_1 oberer Hahn. h_2 unterer Hahn. [illegible]
St Steigrohr. *Kr* Kristallisierschale mit [illegible] darauf. *Tr* Kapillartrichter.

Zu diesem Gasometer gehört noch ein Trichter mit feiner Öffnung; er ist aus einer 2 *cm* im Durchmesser starkwandigen und 9 *cm* langen Glasröhre gefertigt, die sich an ihrem unteren Ende plötzlich stark ver-

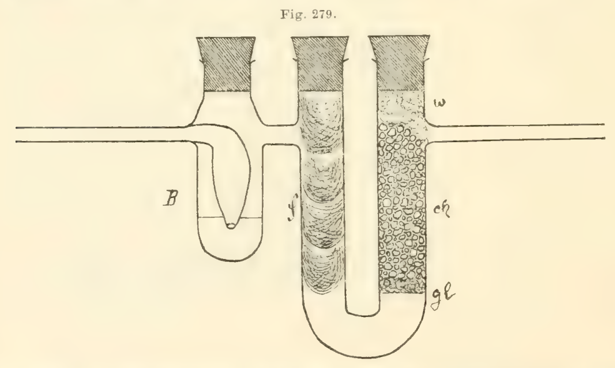
jüngt und in eine Kapillare übergeht, welche dem aufgegossenen Quecksilber den Durchtritt nur in einem Tempo gestattet, wie es der Gasstrom während einer gut geleiteten Verbrennung haben soll, d. d. die Füllung des ganzen Gasometers durch diesen Trichter soll mindestens 15 Minuten in Anspruch nehmen.

Außer der Erfüllung des schon genannten Zwecks, die ausgetretenen Gase einer nochmaligen Verbrennung zuzuführen, stellt dieser Apparat eine Vorrichtung dar, mit welcher es wie mit keinem anderen Mittel möglich ist, die Gleichmäßigkeit der vor sich gehenden Verbrennung zu beurteilen, denn wenn zuviel Substanz auf einmal verbrennt, so gibt sich dies sofort in einem starken Sinken des Quecksilbers im Steigrohr kund, weil sowohl durch die Absorption der reichlich gebildeten Kohlensäure, sowie durch die Bindung von Sauerstoff an etwa reduziertes Kupfer eine starke Verminderung des Innendrucks entsteht.

Der Apparat zum Trocknen des Sauerstoffs und der Luft.

Schon seit Jahren habe ich für diesen Zweck bei Verbrennungen nach dem älteren Verfahren einen Apparat nach meinen Angaben verwendet,

Fig. 279.



U-Rohr mit Blasenzähler zum Trocknen und Reinigen des Sauerstoffs und der Luft. *B* Blasenzähler. *f* Glaswollflocken, mit 50% Kalilauge befeuchtet. *gl* Glaswollbäuschchen. *ch* Chlorkalzium, schaumig, pfefferkorngroß. *w* Wattebäuschchen.

der sich zu diesem Zweck seiner Einfachheit halber und seiner großen Sicherheit wegen mit bestem Erfolg bewährte. Für das hier zu beschreibende Verfahren benutzte ich im Prinzip denselben Apparat, nur ist er den geänderten Größenverhältnissen entsprechend kleiner. Er besteht im wesentlichen aus einer U-Röhre (Fig. 279), deren Schenkel 7—8 *cm* hoch und aus einer Röhre von 12 *mm* Durchmesser hergestellt sind. Die beiden Schenkel besitzen, wie sonst die U-Röhren, seitliche Ansätze. Der eine dieser beiden Ansätze ist jedoch bei diesem Apparat in unmittelbarer Verbindung mit

einem Blasenzähler von etwa 17—18 *mm* Durchmesser und 5 *cm* Länge, der sich in seinem oberen Ende ebenfalls auf den Durchmesser von 12 *mm* verjüngt. In diesen Blasenzähler hinein führt das zweite seitliche Ansatzrohr, durch welches der bei der Verbrennung benötigte Sauerstoff eintritt. Es setzt sich in das Innere des Blasenzählers nach unten in Form eines erweiterten Rohres fort. Dieser Blasenzähler hat die Bestimmung, mit soviel 50%iger Kalilauge gefüllt zu werden, daß das konisch verjüngte Ende des inneren sich erweiternden Endteiles 1—2 *mm* unter das Niveau der Kalilauge eintaucht. Unter diesen Umständen ist auch im Falle der Rückstauung des Gases ein Austreten von Kalilauge nicht zu befürchten, weil sie in der erwähnten Erweiterung einen Platz finden würde. Der dem Blasenzähler benachbarte Schenkel des U-Rohres wird mit Glaswolleflocken gefüllt, die zuvor in einer Schale mit wenig 50%iger Kalilauge befeuchtet wurden. Im zweiten Schenkel des U-Rohres befindet sich zwischen Glaswolle schaumiges Chlorcalcium.

Das Verbrennungsgestell.

Ein eigentlicher Verbrennungsofen ist für die Durchführung solcher Miniaturverbrennungen durchaus nicht erforderlich. Es genügt dazu ein einfaches, aus Schwarzblech gefertigtes Gestell, welches gestattet, daß das Verbrennungsrohr in horizontaler Lage in einer Höhe von etwa 22 *cm* bequem Platz findet. Die zwei seitlichen Teile (Fig. 287, s_1 s_2), welche oben je einen rechtwinkeligen Einschnitt tragen, in welchem das Verbrennungsrohr Platz finden soll und die nach unten verlängert die Füße des ganzen Gestelles vorstellen, sind durch drei leicht abnehmbare Bandeisen (Fig. 287, *qu*) in der gegenseitigen Entfernung von 16 *cm* gehalten. Das eine der drei Bandeisen verbindet die, dem Experimentator abgekehrten hinteren Fußpaare, die beiden andern verlaufen zu beiden Seiten der Verbrennungsrohre und verbinden die korrespondierenden Flanken der beiden rechtwinkligen oberen Einschnitte. Auf diese beiden Bandeisen läßt sich ein rechtwinklig M-förmig gebogener Eisendraht als Auflage für ein rechtwinklig gebogenes Drahtnetz anbringen.

Der Diffusionsstöpsel (Fig. 280, *D*).

Er hat eine Länge von 4 *cm* und besteht aus einer Jenaer Hartglasröhre von 5—6 *mm* äußerem Durchmesser, die einerseits abgeschmolzen, andrerseits stark verjüngt und ausgezogen ist. Das ausgezogene Ende wird, ohne daß es dabei zur Verschließung des Lumens käme, in der Flamme zu einem Häkchen gebogen, an welchem sich dieser Diffusionsstöpsel aus der Verbrennungsröhre mittelst eines Drahtes leicht herausziehen läßt. Der zylindrische Teil dieses Diffusionsstöpsels ist mit einer einfachen Lage dünnen Platinblechs umwickelt. Durch scharfes Erhitzen in der Gebläseflamme wird dieses Platinblech zum dauernden Haften am Glase gebracht. An das geschlossene Ende schmilzt man eine aus etwa 6 feinen, 1 *cm* langen Platindrähten gebildete Quaste an. (Siehe Fig. 280, *D*.)

Das Verbrennungsrohr.

Es besteht aus einer Jenaer Hartglasröhre von 9—10 *mm* äußerem Durchmesser und 25 *cm* Länge. Das eine Ende verjüngt man durch anfängliches Ausziehen und späteres Zusammenfallenlassen in der Flamme derart, daß dadurch ein 10 *mm* langes, dickwandiges Röhrchen von 4 *mm* äußerem und entsprechend geringerem inneren Durchmesser entsteht. Dieser „Schnabel" *(s)* wird erst auf Carborundumpapier so abgeschliffen und später auf feinem Schmirgelpapier nachpoliert, daß seine Mündung auf der Achse des ganzen Rohres normal steht. Diese Einrichtung, welche, so viel mir bekannt, zuerst *Kopfer* in Anwendung gezogen hat, war für das Gelingen des Verfahrens von entscheidender Wichtigkeit, da ja doch der Kautschuk für den Zweck der Verbrennungsanalyse an und für sich sehr wenig Eignung besitzt; ist er ja doch hygroskopisch und gestattet er dem Kohlendioxyd willig den Durchtritt. Die Verschließung des Verbrennungsrohres mit einem Kautschukpfropfen bei einem Verfahren, welches auf die Wägung der Kohlensäure und des Wassers in seiner Gesamtheit angewiesen ist, mußte das Resultat stets nachteilig beeinflussen und daher wurde überall darauf gesehen, daß der Gasstrom an keiner Stelle mit der Kautschukoberfläche in Berührung kommt und insbesondere wurde der Anschluß der Verbrennungsröhre an das Chlorcalciumrohr durch eine Kautschukschlauchverbindung hergestellt, welche sich zur Hälfte auf dem Schnabel des Verbrennungsrohres, zur Hälfte über das Rohr des Chlorcalciumröhrchens erstreckt. Es hat sich ferner als wichtig erwiesen, daß diese Schlauchverbindung so angelegt wird, daß nicht nur innerhalb dieser Glas an Glas zur Berührung kommt, sondern daß der übergestülpte Kautschukschlauch überdies der Länge nach über dem Röhrchen gestreckt erscheint, wodurch für die Dauer der Analyse die innigste Berührung der aneinander gefügten Glasteile gewährleistet ist. Eine Außerachtlassung dieser Vorschriften war stets von Mißerfolgen begleitet.

Die Füllung und Herrichtung des Verbrennungsrohres.

A. Für die Verbrennung von Körpern, welche nur C, H und O enthalten.

Man schiebt bis zum Schnabel des Rohres einen 1 *cm* langen Pfropfen Glaswolle *(gl)*, auf diesen eine 4 *cm* lange Schichte von Kupferoxydasbest *(Cu O)* (nach den Angaben des Verf. bereitet ihn die Firma *E. Merck*), dem man zweckmäßigerweise etwas drahtförmiges Kupferoxyd *(Kahlbaum)* beimengt, um der sonst leicht zusammendrückbaren Masse festeren Halt zu geben, darauf ein kleines Bäuschchen Seidenasbest *(As)*, auf dieses locker gefüllten Pt-Asbest *(Pt)*, den man wieder durch ein kleines Bäuschchen Seidenasbest *(As)* vor der nun folgenden 4 *cm* langen Schichte Kupferoxydasbest *(Cu O)* schützt, auf diese wieder ein Bäuschchen Seidenasbest *(As)* und dann ein zusammengefaltetes Stück Platinblech oder Platinasbest

(Pt) von 1 *cm* Länge.[1]) Die zweimalige Verwendung von Platin als Kontaktsubstanz hat seinen Grund in der Überlegung, daß erstens Platin schon bei niedrigerer Temperatur als das Kupferoxyd die Verbrennung einzuleiten vermag, und daß zweitens auch in dem Falle, als an der ersten Stelle schon Sauerstoffmangel aufgetreten sein sollte, an der zweiten Platinfüllung wahrscheinlich noch elementarer Sauerstoff aus einem früheren Stadium der Verbrennung vorhanden sein dürfte.

B. Für die Verbrennung von Körpern, welche außer C, H und O auch N, Halogene oder S enthalten. (Fig. 280.)

Auf den im verjüngten Teil des Rohres befindlichen Glaswollstöpsel bringt man in diesem Falle eine Schichte von 2·5—3 *cm* gekörntes Bleisuperoxyd *(Bl)* von Hanfkorngröße *(E. Merck)*, darauf ein Bäuschchen Seidenasbest, und auf dieses die Füllung von derselben Art und Ausdehnung, wie sie in *A.* geschildert ist.

Um das Bleisuperoxyd dauernd auf der erforderlichen Temperatur von 180—200° zu erhalten, wickelt man um das Rohr einen 5 *cm* breiten Streifen von ausgeglühtem Kupferdrahtnetz *(Sp)* in 4 straffen Lagen, legt auf die 4. Lage ein ⊐-förmig gestaltetes Stück Kupferdraht *(Kd)*, den sogenannten „Heizdraht", und wickelt darüber wieder 3—4 Lagen Kupferdrahtnetz. Der verwendete Kupferdraht sei ca. 1·5 *mm* dick, die Länge der beiden Schenkel betrug 7 *cm*, und die Länge des Zwischenstückes 14 *mm*. Nach Umschnürung der Kupferrolle mit feinem Kupferdraht an beiden Enden, schiebt man sie so zurecht, daß das eine Ende mit dem Beginn der Verjüngung der Röhre zusammenfällt, und zieht den darin befindlichen Drahtbügel soweit vor- oder rückwärts, daß sein gebogenes Zwischenstück nach dem Herunterbiegen die Stelle des Rohres fest berührt, wo sein konischer Teil in den engen Schnabel übergeht.

Bei dieser Anordnung werden die freien Enden der Schenkel ca. 1 *cm* weit über die

[1]) Siehe darüber auch *Haldermann* und *Schall*, Ber. 43, S. 342—345, welche darin über eine von *R. Weitzenböck* ausgearbeitete Methode berichten.

Kupferrolle hinausragen und dadurch beim Gebrauch in das Bereich der Flamme kommen, während das durch Leitung erwärmte Zwischenstück die Kondensation von Wasser im Schnabel dauernd verhindern wird.

Den hinter diesem einfachsten Luftbad befindlichen Anteil des gefüllten Rohres umwickelt man zur Schonung und der gleichmäßigeren Erhitzung wegen mit einer einfachen Lage feuchten Asbestpapieres, und nach völliger Trocknung dieses mit einer einfachen Lage ausgeglühten Eisendrahtnetzes.

Das weite, hintere Ende des Verbrennungsrohres verschließt man, nachdem man die Ränder in der Flamme hat ablaufen lassen, mit einer 5 *cm* langen, 4 *mm* im äußeren Durchmesser betragenden Thermometerröhre *(Th)*, die zu einer Spitze ausgezogen ist, indem man bis etwa in die Mitte dieses Röhrchens ein ringförmiges Stückchen eines passenden Kautschukschlauches *(R)* darüberschiebt. Wie alle Kautschukdichtungen und -verbindungen, soll auch diese mit einer unwägbaren Spur Glyzerin befeuchtet werden.

Für die Ausführung von C-H-Bestimmungen und auch für die N-Bestimmungen genügt ein gewöhnlicher Tisch (an dem zwei Gashähne für die beiden Brenner zur Verfügung stehen), auf dessen Platte man zum Schutz gegen die strahlende Wärme, aber auch aus Rücksichten der Reinlichkeit ein Stück glattes Packpapier aufbreitet. Hingegen dürfte die Wahl des Raumes, in welchem die Verbrennungen gemacht werden sollen, nicht gleichgültig sein, wenigstens vermeide ich es, solche Bestimmungen im Laboratorium zu einer Zeit zu machen, wo die Luft massenhaft mit Gasen und Dämpfen geschwängert ist.

Die Reinlichkeit sämtlicher Operationen erlaubt es, die C-H-Bestimmungen im Wagezimmer auszuführen. Übrigens sind sämtliche schwingende Teile der Wage platiniert, also kaum angreifbar.

Die so vorbereitete Verbrennungröhre legt man derart in das Verbrennungsgestell, daß die Kupferrolle darüber hervorragt und gleichzeitig die eine Seitenwand desselben berührt. Die beiden freien Enden des Drahtbügels befinden sich oben, zu beiden Seiten der Röhre, und werden ins Bereich des unter ihrer Füllung befindlichen Flachbrenners hineinragen. Den gefüllten Teil des Rohres innerhalb des Gestelles bedeckt man mit einer Asbest- oder Eternitplatte von 7 *cm* Länge und 5 *cm* Breite. Das das hintere Rohrende verschließende Thermometerröhrchen verbindet man mit Hilfe eines mit Glyzerin etwas befeuchteten Gummischlauchstückes mit dem an einem kleinen Eisenstativ hängenden Apparate zum Reinigen und Trocknen des Sauerstoffes und der Luft, indem auch hier Glas an Glas in Berührung kommen, und verbindet diesen Apparat mittelst eines längeren Gummischlauches mit dem Sauerstoffgasometer. Mit einem guten Schraubenquetschhahn reguliert man den Sauerstoffstrom so, daß etwa 2—3 Blasen (höchstens 4!) in der Sekunde den Blasenzähler passieren. Zum Zwecke des Ausglühens bringt man den Flachbrenner zuerst auf 2 Minuten unter den leeren Teil, dann unter den gefüllten Teil des Rohres.

Sehr wichtig für das Ergebnis der Analyse ist die Temperatur der Kupferrolle. Zu deren Messung bediene ich mich zweier Substanzen von bekanntem Schmelzpunkt, die auf die einzelnen Abschnitte der Rolle mit einem zwischen den Lippen befeuchteten Platindraht aufgestaubt werden. An dem Ende der Rolle, das dem Rohrschnabel näher liegt, soll wohl Cholesterin (F = 146°), nicht aber Cholalsäure (F = 197°) schmelzen; am anderen Ende sowie auf der daran angrenzenden Hälfte der Rolle sollen beide schmelzen. Die Einstellung der Temperatur erfolgt durch Verschiebung der Flamme, nötigenfalls durch Kürzung der beiden ins Flammenbereich hineinragenden Drahtenden. Bei Wiedereinhaltung derselben Bedingungen wird man bei demselben Rohr immer wieder dieselben Temperaturverhältnisse erzielen. Sollte einmal versehentlich die Temperaturgrenze überschritten worden sein oder das Bleisuperoxyd stark hellere Verfärbungen zeigen, so wechsle man es oder verdampfe zum mindesten während des Ausglühens einen Tropfen konzentrierter Salpetersäure, den man im Schiffchen in das Verbrennungsrohr eingeführt hat.

Ist der Sauerstoffstrom in der geschilderten Weise während des Ausglühens durch 10 Minuten durch das Rohr geschickt worden, so kann man mit der Verbrennung beginnen.

Die Absorptionsapparate.

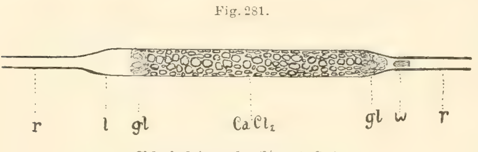
Für den Bau dieser war von allem Anfange an die Vermeidung komplizierter Oberflächen, einspringender Winkel und vorspringender Kanten geboten. Anfänglich verwendete ich solche aus gewöhnlichem Eprouvettenglas mit einem äußeren Durchmesser von 14 *mm* und einem, die Absorptionsmittel aufnehmenden Raum in einer Länge von 14 *cm*. Bei diesem immerhin großen Raum war der Einfluß der Temperatur bei der Gewichtsbestimmung so groß, daß es stets mühsamer Wiederholungen der Wägungen erforderte, bis die richtige endgültige Zahl ermittelt werden konnte. Im vorletzten Sommer war diese große Abhängigkeit von der Temperatur wegen der hohen Sommertemperatur in Graz nicht sehr auffällig störend. Anders hingegen gestaltete sich die Sache während der kühlen Herbsttage in Innsbruck, wo immer lange Zeit erforderlich war, um das endgültige Gewicht der Absorptionsapparate zu ermitteln. Daher habe ich bald darauf den Apparaten eine Form gegeben, welche sie im höchsten Grade unabhängig macht von den störenden Temperatureinflüssen. Für die Absorption des Wassers sowie des Kohlendioxyds werden röhrchenförmige Apparate verwendet, welche aus einer äußerst dünnwandigen, 8 *mm* im äußeren Durchmesser messenden Glasröhre angefertigt sind (sogenanntes „Spindelglas", weil daraus Aräometerspindeln gemacht werden).

A. Beim Chlorcalciumrohr ist der 8 *mm* im äußeren Durchmesser messende Rohrabschnitt 7 *cm* lang. An beiden Enden verjüngt er sich und geht in 4 *mm* im äußeren Durchmesser betragende, starke Röhrchen *(r)* über. Vor dem Ansetzen des zweiten Röhrchens füllt man in den konisch verjüngten Teil ein Bäuschchen festgestopfter Glaswolle *(gl)*,

hierauf eine 5 *cm* lange Schicht feinschaumigen Chlorcalciums von Hirsekorngröße und darauf fest angepreßt neuerlich ein Bäuschchen Glaswolle *(gl)*. Wenn nun das zweite Röhrchen an das noch offene Ende angesetzt wird, so bleibt ein 1—1½ *cm* langer Teil *(l)* des Rohrinnern leer und dient bei der Verbrennung zur Aufnahme des sich kondensierenden Wassers (Fig. 281).

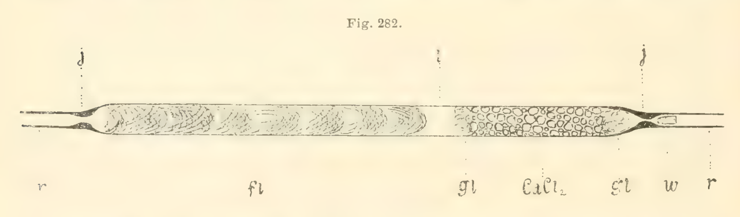
B. Das Kalirohr (Fig. 282) besitzt in seinem mittleren Teil eine Länge von 12 *cm*. Auch hier wird die Füllung während der Anfertigung vor der Glasbläserlampe vorgenommen und zwar, nachdem an der einen Seite ebenfalls ein etwa 4 *mm* im äußeren Durchmesser messendes starkes Röhrchen *(r)* in der Länge von 4—5 *cm* angesetzt worden ist. Man bringt dann in die Verjüngung ein Bäuschchen Glaswolle *(gl)*, hierauf eine 3 *cm* lange Schichte von Chlorcalcium und auf diese fest gepreßt ein Bäuschchen Glaswolle *(gl)*. Nun schiebt man mit einer engen Glasröhre eine Flocke *(fl)* von Glaswolle bis in die Nähe des Glaswollbäuschchens, so zwar, daß zwischen beiden ein Raum von etwa 1 *cm* vollkommen leer *(l)* bleibt. Nun füllt man eine Strecke von 6—8 *cm* des Rohres mit lockerer Glaswolle, indem man Flocke an Flocke *(fl)* anreiht, verjüngt es am Ende und setzt,

Fig. 281.



Chlorkalziumrohr (2/3 nat. Gr.).
r Ansatzröhrchen. *w* Wattepfröpfchen. *gl* Glaswolle, gestopft. *l* leerer Raum. $CaCl_2$ Chlorkalzium, schaumig, pfefferkorngroß.

Fig. 282.



Kalirohr (2/3 nat. Gr.).
r Ansatzröhrchen. *w* Wattepfröpfchen. *j* Verjüngungen des Lumens. *gl* Glaswolle, gestopft. *fl* Glaswollflocken. *l* leerer Raum. $CaCl_2$ Chlorkalzium, schaumig, pfefferkorngroß.

so wie an dem gegenüberliegenden Ende, das 4 *mm* im äußeren Durchmesser betragende Verbindungsröhrchen vor der Bläserlampe an.

Durch Hineinhalten des mit Glaswolle gefüllten Anteils in die Bunsenflamme gelingt es, die Flocken stellenweise zum Ansintern zu bringen und ein nachträgliches Verschieben der Flocken beim Füllen mit Lauge zu verhüten. Durch Verdickung der Wandstärke der beiden Verbindungsröhrchen erzeugt man auf einer Strecke von 2 *mm* eine Verjüngung *(j)* des Lumens bis auf einen ½ *mm*. Zur Schonung des Chlorcalciums schmilzt man die beiden Verbindungsröhrchen etwa 4 *cm* von den Ansatzstellen entfernt ab

und kann solche Kaliröhrchen unbegrenzt lange vorrätig halten. Vor dem Gebrauch werden die abgeschmolzenen Enden mit dem Glasmesser gerade abgeschnitten und die beiden Schnittflächen ebenso wie bei dem Chlorcalciumrohr zuerst auf Carborundumpapier eben geschliffen und auf feinstem Schmirgelpapier glatt poliert. Ins Ansatzröhrchen neben dem $Ca Cl_2$ schiebt man eine Flocke Watte halb hinein, schneidet den herausragenden Teil knapp mit der Schere ab und schiebt das darin befindliche Ende bis an die kapillare Verjüngung. Dieser kleine Wattepfropfen ist eine Sicherung gegen Gewichtsverluste, die durch Verstäuben von $Ca Cl_2$ bedingt sein konnten.

Zum Zwecke der Füllung setzt man an das mit $Ca Cl_2$ gefüllte Ende des Kaliröhrchens mittelst eines Schlauchstückes ein altes Chlorcalciumrohr, an dieses einen Kautschukschlauch und zieht nun 50%ige Kalilauge so weit vorsichtig auf, als die locker gestopfte Glaswolle reicht, also bis zum leeren Raum von 1 *cm* Länge und bläst sie nachher aus. Nach vorsichtiger Reinigung des gesamten Kalirohres mit einem feuchten und mit einem trockenen Lappen und nach wiederholtem Auswischen des nassen Ansatzröhrchens mit einem auf einen Draht aufgewickelten Wattebauschchen verschließt man beide Enden mit den üblichen Kautschukverschlüssen. Dazu verwende man 15 *mm* lange Stücke eines neuen, streng passenden Schlauches, die mit Hilfe einer Feder mit Seife und Wasser gut ausgeputzt und nach dem Trocknen mit einem auf einem Zündholz straff aufgewickelten Wattebausch, der mit Glyzerin befeuchtet ist und danach mit einem zweiten, trockenen Wattebausch ausgerieben werden. Dieselbe Behandlung haben auch alle später zu erwähnenden Schlauchverbindungen, die bei Ausführung der Verbrennung zur Benutzung kommen, zu erfahren, denn die unwägbare Glyzerinmenge, die dabei im Schlauch zurückbleibt, ermöglicht nicht nur ein leichtes Gleiten über den Glasoberflächen und sicherere Anschlüsse von Glas an Glas, sondern setzt vielleicht sogar der Diffusion von Gasen größeren Widerstand entgegen als reine Kautschukoberflächen. Daher ist auch nach einiger Zeit, wenn die Schläuche „schwer gehen", diese einfache Prozedur zu wiederholen.

Ein so beschicktes Kalirohr kann für zwei Verbrennungen Verwendung finden. Bei neuerlicher Beschickung mit Kalilauge hat man durch mehrmaliges Ausziehen und Ausblasen von Kalilauge das im Röhrchen gebildete Kaliumkarbonat zu entfernen. Nach etwa 10—15maligem Gebrauch des Röhrchens ist das $Ca Cl_2$ schon so feucht geworden, daß dadurch Fehler bedingt werden. Um es zu trocknen, jagt man durchs Rohr einen raschen Strom von trockenem Sauerstoff und erwärmt den zuvor mit etwas Kupferdrahtnetz umwickelten Teil des Rohres, welcher das $Ca Cl_2$ enthält, vorsichtig über einer rußenden Gasflamme.

Auch das $Ca Cl_2$-Rohr muß man nach etwa 10—15maligem Gebrauch in der beschriebenen Weise entwässern. Je später man diese Regeneration vornimmt, desto leichter kann es zum Schmelzen und Verstopfen des Rohr-

chens kommen. Nach jeder solchen Regeneration des Ca Cl_2-Rohres ist es natürlich notwendig, die bekannte Sättigung mit CO_2 vorzunehmen und dieses mit Luft zu vertreiben.

Die so gereinigten und verschlossenen Absorptionsapparate legt man neben die Wage, am besten auf ein in jeder Papierhandlung um wenig Geld erhältliches, meist aus Draht angefertigtes Gestelle für Federn und Bleisteifte, wo jeder Absorptionsapparat nur auf 2 Punkten aufliegt. Dort erfolgt in 15—20 Minuten der völlige Temperaturausgleich, die wichtigste Voraussetzung für die Bestimmung des wahren Gewichtes.

Zu diesem Zwecke faßt man den Absorptionsapparat bei dem einen Kautschukverschluß und entfernt den zweiten, wischt das zutage getretene Röhrchen mit dem mehrfach zusammengelegten Gazelappen ab, entfernt hierauf die erste Verschlußkappe und reinigt mit dem zweiten Lappen dieses Röhrchen. Dieser Vorgang hat, ohne den Absorptionsapparat mit der bloßen Hand zu berühren, rasch und leicht zu geschehen, worauf man diesen an einem Ende mit dem Lappen haltend auf den an die Wage gehängten Doppelhaken aus Aluminiumdraht (Fig. 1) auflegt. Das Gewicht des Chlorcalciumrohres kann sofort bestimmt werden; es wiegt etwas über **3 *g*!** Für das Kalirohr hingegen, welches rund **5 *g*** (!) wiegt, ist bei der Wägung sowohl vor als nach der Verbrennung folgendes zu beachten:

1. Wägt man ein tadellos verschlossen gewesenes Kalirohr nach etwa 12 Stunden wieder, so wird sich nur eine Gewichtszunahme von wenigen $^1/_{100}$ *mg*, bei hoher Temperatur und Feuchtigkeitssättigung der Luft vielleicht $^1/_{10}$ *mg* nachweisen lassen.

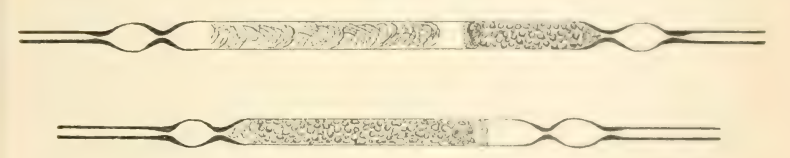
2. Läßt man an der Wage ein offenes, gewogenes Kalirohr 2 bis 3 Stunden hängen, so beobachtet man bei niedriger Temperatur (16°) und geringem Feuchtigkeitsgrad Zunahmen, welche für je 5 Minuten höchstens 0·01 *mg* betragen, während das Kalirohr bei hoher Lufttemperatur (25°) und damit verbundener großer absoluter Feuchtigkeit bis zu 0·03 *mg* in je 5 Minuten zunehmen kann.

Diese Gewichtsänderung des offenen Kalirohres, die ich seinen „Absorptionsgang“ nenne, ist also im Sommer und im Winter verschieden groß und bedingt es, daß man im Winter zwei Wägungen, die zeitlich um 5 Minuten auseinanderliegen und um etwa 0·01 *mg* differieren, als Beweis der erreichten Gewichtskonstanz ansehen muß, während an heißen Sommertagen jenes Gewicht als das richtige genommen werden muß, von dem ab das Kalirohr den regelmäßigen Absorptionsgang zeigt. Wie die Erfahrung lehrte, ist dieses Gewicht sowohl im Sommer als auch im Winter sofort oder nach 5 Minuten an der Wage meist erreicht, wenn das Kalirohr, wie vorher geschildert, nach 20 Minuten währendem Liegen neben der Wage beim Anfassen und Auflegen auf diese keine Erwärmung durch die Finger erfahren hat.

In allerjüngster Zeit ist es mir gelungen, durch eine kleine Abänderung an den beiden Absorptionsapparaten die geschilderte Erscheinung des Absorptionsganges vollständig zu beseitigen, das heißt, die Apparate

zeigten im Verlaufe einer halben Stunde, auf der Wage offen hängend, auch nicht die geringste Gewichtszunahme innerhalb der 5. Dezimale, während die früher beschriebenen zu gleicher Zeit einen Absorptionsgang von 0·02 *mg* in je 5 Minuten darboten. Daher ist bei den neuen Apparaten das höchste Gewicht, welches sie nach einigem Verweilen auf der Wage zeigen, auch das wahre Gewicht, und es entfällt somit bei ihnen die Notwendigkeit, das wahre Gewicht durch Extrapolation auf Grund der Kenntnis des Absorptionsganges zu ermitteln. Diese neuen Absorptionsapparate (Fig. 283) unterscheiden sich von der früheren Form dadurch, daß sie bei sonst gleichgearteter Füllung etwas dünner sind und an den beiden Enden eine olivenförmige Erweiterung von zirka 1·5 cm^3 Inhalt tragen. Jede dieser Oliven kommuniziert durch je eine kapillare Verengerung einerseits mit dem Innenraum, andrerseits mit dem Endröhrchen und hat den Zweck, der diffundierenden Feuchtigkeit ein breites Strombett darzubieten, bevor sie auf das sie bindende Absorptionsmittel gelangt. Die Füllung des Kali-

Fig. 283.



Neue Form der Absorptionsapparate (2/3 nat. Größe).

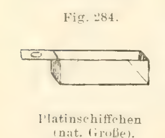
röhrchens geschieht mit Lauge, wie schon früher beschrieben, nur wird in diesem Falle am Schluß die mit Kalilauge benetzte Olive wiederholt mit destilliertem Wasser ausgespült. Die kleineren Dimensionen dieses Kalirohres bedingen es, daß vor jeder Verbrennung eine neue Füllung mit Kalilauge notwendig ist. Während man den früher beschriebenen Absorptionsapparaten etwa 60 *mg* Kohlendioxyd zumuten dürfte, kann man bei diesen nur auf die Absorption von etwa 40—50 *mg* CO_2 mit Sicherheit rechnen. Ein weiterer Vorteil dieser neuen Absorptionsapparate ist daraus zu ersehen, daß wir bei Verbrennung verläßlich reiner Substanzen oft Unterschiede gefunden haben, die nur in der zweiten Dezimale des Prozentgehaltes zum Ausdruck kommen.

Mit diesen Apparaten sind auch die unter *(b)* auf S. 1349 angeführten Beleganalysen durch meinen jetzigen Assistenten Herrn *Dr. S. Edlbacher* gewonnen worden, nachdem er von mir in den hier beschriebenen Methoden unterwiesen worden war. Ich bin dadurch erst zu dem Urteil gekommen, daß sämtliche hier beschriebenen Bestimmungsarten von einem geschickten, ausgebildeten Chemiker in 8—10 Tagen erlernt und beherrscht werden können.

Vorbereitung der Substanz zur Analyse.

Die Wägung der Substanz und deren Verbrennung erfolgt in einem kleinen Platinschiffchen[1]) (Fig. 284). Dieses habe ich mir durch Zusammenbiegen eines Stückes Platinblech auf einer entsprechend zugeschnittenen Form aus Holz zusammengebogen. Die beiden Schmalwände stellen Quadrate von 4 *mm* Seite dar, die Länge des Troges beträgt 15 *mm*, die des Griffes 6 *mm*. In der Mitte des Griffes ist ein rundes Loch von 2 *mm* Durchmesser ausgestanzt. Vor jeder Verbrennung wird das Schiffchen in verdünnter Salpetersäure ausgekocht, an einem Platinhäkchen bis zum Verschwinden der Na-Flamme ausgeglüht und auf einen Kupferblock gestellt. In wenigen Sekunden erreicht es auf diesem die Temperatur des Wagenzimmers. Nach der Verbrennung mancher Körper erwies sich sein Gewicht auch nach dem Auskochen mit Salpetersäure größer als zuvor; Ausschmelzen mit saurem Kaliumsulfat oder Erhitzen mit Flußspat und Schwefelsäure stellten dann stets wieder sein ursprüngliches Gewicht her. Man fasse und übertrage das Schiffchen z. B. vom Kupferblock auf die Wage oder ins Verbrennungsrohr stets nur mit einer rein gewaschenen und geglühten, mit Platinspitzen versehenen Pinzette.

Fig. 284.



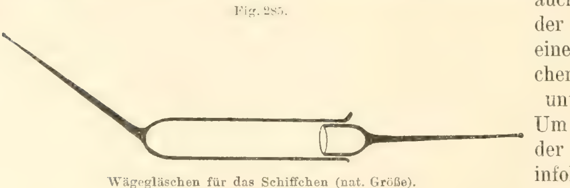
Platinschiffchen (nat. Größe).

Ist der zu analysierende Körper lufttrocken zu verwenden, so wird er mit Hilfe der rein abgewischten Spitze eines Federmessers in das zuvor offen gewogene Schiffchen in einer Menge von rund 10 *mg* eingebracht und gewogen. Ich habe niemals weniger als 7 *mg* und nie mehr als 13 *mg* angewendet.

Vor dem Auflegen auf die Wage faßt man das Schiffchen mit der linken Hand mittelst der Platinpinzette, klopft zum Zwecke der Verteilung der Substanz am Boden des Schiffchens einige Male mit dem Zeigefinger der Rechten auf die Linke und pinselt das Schiffchen von allen Seiten sorgfältig mit einem feinen Marderhaarpinsel ab.

Bei hygroskopischen Körpern verbietet sich die Wägung im offenen Schiffchen, und man ist daher genötigt, sowohl das leere Schiffchen, als auch dieses samt der Substanz in einem Wägegläschen (Fig. 285) unterzubringen. Um den Einfluß der Erwärmung infolge Anfassens des Wägegläschens beim Einführen des mit der Platinspitzenpinzette gefaßten Schiffchens möglichst auszuschalten, habe ich beistehende Form gewählt; die langen und dünnen Griffe nehmen, da ihre Masse klein ist, trotz der

Fig. 285.



Wägegläschen für das Schiffchen (nat. Größe).

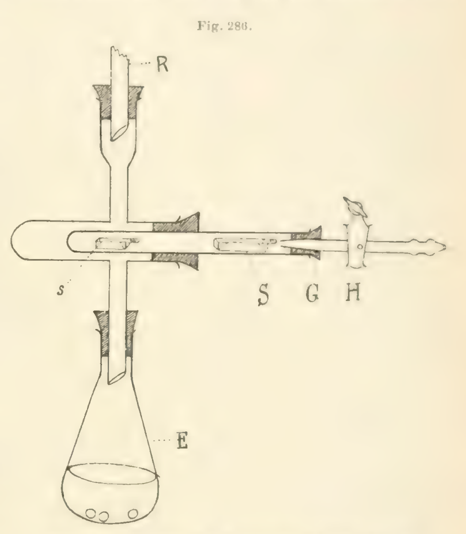
[1]) Zu beziehen von der Platinschmelze Heraeus in Hanau a. M.

großen Wärmekapazität des Glases nur sehr wenig Wärme auf, und man erreicht in längstens einer Minute die gewünschte Gewichtskonstanz.

Es soll ausdrücklich hervorgehoben werden, daß das Wageglaschen weder im Exsikkator noch bei höherer Temperatur getrocknet werden darf; man hebe es stets unter einer Glocke im Wagezimmer auf, damit seine Oberfläche seine konstante Sättigung mit Wasser beibehält.

Ist es notwendig, den Körper zu trocknen, so wird man ihn samt Schiffchen entweder in den Exsikkator auf ein Uhrglas stellen oder, wenn höhere Temperaturen erforderlich sind, sich am besten des kleinen Apparatchens (Fig. 286) bedienen, das durch die nebenstehende Zeichnung dargestellt wird. Durch Wahl des in das 50 cm^3 fassende Erlenmeyerkölbchen *(E)* eingefüllten Lösungsmittels (Alkohol, Wasser, Eisessig, Xylol etc.) bestimmt man die Temperatur, bei welcher getrocknet werden soll. Die im gewogenen Schiffchen abgewogene Substanz schiebt man in die kleine Eprouvette bis an deren Ende, indem man das Schiffchen *(s)* zum Schutz vor Beschmutzung auf ein kleines Stück Messingblech stellt und dieses vorschiebt. Nahe der Öffnung dieses Röhrchens stellt man, ebenfalls auf einem Blechstückchen, ein etwa doppelt so großes Platinschiffchen *(S)*, das mit dem entsprechenden Trockenmittel gefüllt ist. Meist lege ich lange Asbestfasern hinein und befeuchte sie mit 5–8 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure. Durch ein unter dem herausragenden Teil der Eprouvette angebrachtes Stück Asbestpappe schützt man das Trockenmittel vor Erwärmung. Die Mündung des Röhrchens wird mit einem mit Glashahn *(H)* versehenen Gummistopfen *(G)* verschlossen und mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Dieses Auspumpen ist zu wiederholen, sobald die Flüssigkeit im Kölbchen ins Sieden geraten und der Rückflußkühler *(R)* in lebhafte Tätigkeit gekommen ist. In der Regel genügt 5—10 Minuten währende Trocknung, um bei zirka 10 *mg* Substanz Gewichtskonstanz zu erreichen.

Fig. 286.



Apparat zum Trocknen im Vakuum bei konstant hoher Temperatur.
E Erlenmeyerkölbchen mit Siedeflüssigkeit und Siedeperlen aus Porzellan. *R* Rückflußkühler. *H* Glashahn. *G* Gummistopfen (die übrigen sind Korke). *s* Schiffchen mit der gewogenen Substanz. *S* großes Schiffchen mit Absorptionsmittel.

Die Ausführung einer Verbrennung (Fig. 287).

Während des Ausglühens des Verbrennungsrohres benutzt man die Zeit zur Wägung der Substanz und der beiden Absorptionsapparate. Die Übertragung der verschlossenen Apparate zur Stelle, wo verbrannt wird, erfolgt auf dem schon erwähnten Drahtgestelle; die der Substanz im Schiffchen auf dem Kupferblock *(K)* im Handexsikkator. Nun fügt man das mit dem Wattepfröpfchen versehene Röhrchen des Chlorcalciumrohres *(ch)* mit dem leeren Ansatzröhrchen des Kalirohres *(k)* mit Hilfe eines 15 *mm* langen Stückes dickwandigen, nahtlosen Kautschukschlauches so aneinander, daß beide Absorptionsapparate infolge der Längsdehnung des Schlauchstückes über den Glasteilen aneinandergepreßt werden und ein starres Ganzes bilden. Hierauf schiebt man über das freie Ansatzröhrchen des Chlorcalciumrohres zur Hälfte ein nur 12 *mm* langes Schlauchstück, legt das Ende des Kalirohres auf ein entsprechend hoch gestelltes Stativchen *(st)* und setzt nun bei festgehaltenem Verbrennungsrohr die Absorptionsapparate an dieses wieder derart an, daß dabei das Schlauchstück die erforderliche Längsdehnung erfährt. Dann schließt man den Quetschhahn der Sauerstoffzuleitung vollständig.

Das offene Ende des Kalirohrs wird genau in die gleiche Höhe gebracht, welche die Mündung des rechtwinklig umgebogenen oberen Röhrchens des Quecksilbergasometers *(G)* besitzt, über das man zuvor schon einen Kautschukschlauch geschoben hat. Nun öffnet man durch Entfernung des Thermometerröhrchens mit dem Kautschukring das hintere Ende des Verbrennungsrohres und bringt das Schiffchen mit der Substanz mit Hilfe der Pinzette ins Rohr, schiebt es mit einem Glasstabe *(g)* nur so weit vor, daß die Substanz dort weder schmilzt noch sonst eine Veränderung erfahren kann, faßt mit der Pinzette den früher beschriebenen Diffusionsstöpsel, glüht ihn in allen seinen Teilen in der rauschenden Bunsenflamme kurz aus und führt ihn so bis an das Schiffchen heran, daß die Platinquaste es umfaßt. Hierauf verschließt man wieder sofort das Verbrennungsrohr und indem man das Endröhrchen des Kalirohres mit zwei Fingern der linken Hand, die sich dabei auf den Gasometer stützt, faßt und mit der rechten Hand das über dem rechtwinkelig umgebogenen Röhrchen des Gasometers befindliche Schlauchstück in schraubenförmigen Touren zur Hälfte darüberschiebt, bewirkt man die Verbindung des Kalirohres *(k)* mit dem Innenraum des Gasometers. Hierauf nimmt man die **unerläßliche Prüfung auf Dichtigkeit** des ganzen Systemes vor. Zu diesem Zweck öffnet man zuerst den oberen Hahn des Gasometers vollkommen und hierauf den unteren so weit, daß eine Niveaudifferenz von zirka 5 *cm* entsteht, worauf man den unteren Hahn wieder schließt. Diese Druckdifferenz muß nun mindestens eine Minute lang vollkommen ungeändert bestehen bleiben, widrigenfalls die Undichtigkeit behoben werden muß. In der Regel ist es das kurze Schlauchstück zwischen Schnabel und $CaCl_2$-Rohr, seltener der hintere Verschluß des Verbrennungsrohres; oft können diese Mängel lediglich durch neuerliches

Auswischen der Schläuche mit Glyzerin vollkommen behoben werden. Nun kann man mit der Verbrennung beginnen, und zwar in der Weise, daß

man die zweite, eben nicht leuchtende Bunsenflamme *(Bb)* unter den Diffusionsstöpsel bringt. Infolge der Ausdehnung der Gase im Innern des Rohres durch die Erwärmung verringert sich die früher beobachtete Niveaudifferenz sehr rasch. Nun läßt man vorsichtig Quecksilber aus dem Gasometer austropfen und gestattet dem Sauerstoff wieder Zutritt in einer Geschwindigkeit von 2 Blasen in der Sekunde. Das Austropfen des Quecksilbers wird nun derart geregelt, daß bei der genannten Geschwindigkeit des Sauerstoffstromes dauernd im Innern des ganzen Systemes ein verminderter Druck bestehen bleibt, dessen Größe durch eine Niveaudifferenz von 1—2 *cm* Quecksilber angezeigt wird. Bei flüchtigen Substanzen wird es nicht notwendig sein, die Flamme von dieser Stelle wegzubewegen; Naphtalin z. B. kann von dieser Stelle aus völlig zur Verbrennung gebracht werden, ja, würde man sich dem Schiffchen nähern, so hätte man sicher darauf zu rechnen, daß es nicht nur zu einer Explosion, sondern sicherlich auch zum Hineindestillieren unverbrannten Naphtalins in die Absorptionsapparate käme, wie ich mich durch Erfahrung überzeugen konnte. Sind die ersten Anzeichen einer Veränderung der zu verbrennenden Substanz im Schiffchen für das Auge deutlich sichtbar eingetreten, wie z. B. Schmelzen, Sublimation oder Bräunung, oder hat die trockene Destillation begonnen, so wird auch sofort für das Auffangen der das Kalirohr verlassenden Gase in der Weise gesorgt, daß durch Handhabung des unteren Hahnes dauernd im Innern des Quecksilbergasometers der Druck um mindestens 1—2 *cm* niedriger ist als der Barometerstand, was sich an der Niveaudifferenz zwischen dem Quecksilber im Gasometer und dem sich daran befindlichen Steigrohr kundgibt. Die Aufrechterhaltung dieser Druckdifferenz gewährleistet Sicherung gegen Undichtigkeiten sämtlicher Kautschukverbindungen und behebt die Mängel, welche ihre Ursache in zu dichten und zu starken Füllungen der Verbrennungsröhre sowie der Absorptionsapparate haben könnten. Je nach Bedürfnis wird man nun entweder die Bunsenflamme vorzuschieben genötigt sein und stets sein Augenmerk auf die Niveaudifferenz im Quecksilbergasometer haben. So bald Kohlendioxyd in größeren Mengen zur Absorption kommt, vergrößert sich die besagte Niveaudifferenz oft um mehrere Zentimeter. Durch Zurückführen des beweglichen Brenners und Schließen des unteren Gasometerhahnes verhindert man auch bei reichlicher Kohlendioxydabsorption, das heißt nach zu rascher Verbrennung eine allzu große Niveaudifferenz und die dadurch bedingte schädliche Geschwindigkeit des Gasstromes.

Durch Übung wird man es lernen, und dies ist unbedingt anzustreben, die Verbrennung der Substanz in solchen Schranken zu halten, daß die Niveaudifferenz keine größeren Schwankungen zeigt, d. h. daß in gleichen Zeiten ungefähr gleichviel Sauerstoff verbraucht und Kohlendioxyd absorbiert wird. A u f j e d e n F a l l i s t a b e r e i n S t e i g e n d e s D r u c k e s i m G a s o m e t e r ü b e r d e n a t m o s p h ä r i s c h e n z u v e r m e i d e n, d e n n d i e s w ü r d e u n b e d i n g t K o h l e n s ä u r e v e r l u s t e n a c h s i c h z i e h e n.

Schon jetzt wendet man sein Augenmerk dem Ansatzröhrchen des Chlorcalciumrohres *(ch)* zu, um zu sehen, ob dort der erste Anflug von kondensiertem Wasser erfolgt ist. Von diesem Moment an bis zur endlichen Abnahme der Absorptionsapparate nach zu Ende geführter Verbrennung bedient man sich nun eines kleinen Hilfsmittels, dem ich, wie ich ruhig sagen kann, die Bestimmbarkeit des Wasserstoffes überhaupt verdanke. Es besteht aus einem 8 *mm* breiten Eisendrahtnetzstreifen, welcher einmal der Länge nach zusammengelegt und überdies noch reiterförmig umgebogen ist. Durch Hineinhalten dieses Eisenreiters in die eine Flamme und Aufsetzen des erhitzten Reiters auf das Ansatzröhrchen des Chlorcalciumrohres, ohne an den Schlauch anzukommen, vermeidet man das Zurückbleiben von kondensiertem Wasser. Namentlich bei der letzten noch zu beschreibenden Durchleitung von Luft durch das Röhrensystem ist das Aufsetzen des heißen Reiters mindestens 3—5mal zu wiederholen. Ist man durch Vorrücken des beweglichen Brenners endlich unter das Schiffchen und noch über dieses hinaus bis in die Nähe der Füllung gekommen und sind dabei sämtliche kohlige Anteile der zu verbrennenden Substanz im Sauerstoffstrom verbrannt, so hat man, je nach dem Kohlenstoffgehalt und der Natur des verbrannten Körpers, 5—8 höchstens 10 Minuten gebraucht. Nun schließt man zuerst den unteren Gasometerhahn, dann, wenn sich die Niveaudifferenz bis auf etwa 1 *cm* ausgeglichen hat, nimmt man den Schlauch für die Sauerstoffzuleitung vom Blasenzähler *(U)* ab und schließt endlich den oberen Quecksilbergasometerhahn. Nun trennt man die Verbindung zwischen Kaliröhrchen und Gasometer sowie jene zwischen dem Trockenapparat mit Blasenzähler *(U)* und dem Thermometerröhrchen. Durch Umstellen wird nun der Quecksilbergasometer mit demselben Handgriff, wie wir ihn schon früher für das Kalirohr beschrieben haben, an das Thermometerröhrchen angeschlossen, wobei wieder durch Festhalten desselben eine Verdrehung oder Verschiebung des Verbrennungsrohres und der daran angeschlossenen Absorptionsapparate sorgfältig vermieden wird. Nun wird der kapillare Trichter auf das Steigrohr des Quecksilbergasometers aufgesetzt, dessen oberer Hahn geöffnet und durch portionsweises Hineingießen des abgelaufenen Quecksilbers der Gasinhalt des Quecksilbergasometers durch das vorhandene Röhrensystem restlos durchgedrückt, wozu die Zeit von 3 bis höchstens 8 Minuten erforderlich ist. Nun stellt man neuerdings den Quecksilbergasometer an das Kalirohr und verbindet ihn mit letzterem, während das Thermometerröhrchen neuerlich mit dem Trockenapparat und Blasenzähler verbunden wird. Durch völliges Öffnen des oberen und teilweises Öffnen des unteren Gasometerhahnes wird trockene und kohlensäurefreie Luft durch das ganze System gesaugt, wobei man die Geschwindigkeit dieses Luftstromes durch Handhabung des unteren Gasometerhahnes so reguliert, daß durch den Blasenzähler 2—3 Luftblasen in der Sekunde durchstreichen. Wenn etwas mehr als die Hälfte des im Mikrogasometer enthaltenen Quecksilbers in dieser Weise ausgeflossen ist, wozu ebenfalls eine Zeit von 5 Minuten voll-

kommen hinreicht, so kann man sicher sein, daß aller Sauerstoff aus den Absorptionsapparaten entfernt ist. Sie können dann abgenommen und mit den Kautschukverschlüssen versehen zur Wage gebracht werden. Mitunter kommt es vor, daß infolge zu hoher Erhitzung des Kautschuks etwas davon am Ansatzröhrchen des Chlorcalciumrohres haften bleibt. Durch feuchtes Abwischen ist diese Verunreinigung leicht zu entfernen, solange die Stelle noch warm ist. An der Wage werden die Apparate auf einer Glasplatte in frisch befeuchtete Flanellstücke eingerollt und 3 Minuten darin liegen gelassen, wobei man dafür Sorge trägt, daß die Kautschukverschlüsse mit feuchtem Flanell nicht in Berührung kommen.

Nach dieser Zeit werden beide trocken abgewischt und auf das Drahtgestelle neben der Wage gebracht, wo wenigstens das Kalirohr 15 bis 20 Minuten liegen bleibt, während das Chlorcalciumrohr bald nach dem Abwischen gewogen werden kann. Für die Wägung des Kalirohres beachte man das auf S. 1322 Gesagte. Es wird übrigens von der Umsicht und Übung des Experimentators abhängen, für jede Jahreszeit die einfachsten und günstigsten Bedingungen rasch ausfindig zu machen und anzuwenden, um das gesuchte Gewicht des Kalirohres und damit den richtigen Kohlenstoffwert in kürzester Zeit zu gewinnen. Der sicherste, wenn auch nicht der kürzeste Weg wird aber immer der sein, das tadellos verschlossene Kalirohr entsprechend lang bei der Wage liegen zu lassen und, ohne es zu erwärmen, auf die Wage zu legen und einige Minuten später zu wägen.

Nach dem geschilderten Verfahren braucht man zur Verbrennung von zirka 10 *mg* Substanz 8—10, höchstens 15 Minuten, und wenn wir je nach der zugeleiteten Sauerstoffmenge für die zweite Verbrennung und die darauf folgende Durchleitung von Luft 10—15 Minuten veranschlagen, so benötigt man vom Hinstellen des Brenners unter den Diffusionsstöpsel bis zur Abnahme der Absorptionsapparate 20, höchstens 25 Minuten, so daß wir im ganzen von Beginn an bis zur schließlichen Berechnung der Analyse 50 Minuten zu veranschlagen hätten. Wenn wir bedenken, daß davon rund 20 Minuten auf den Temperaturausgleich der Absorptionsapparate entfallen, so ist es leicht einzusehen, daß man bei Verwendung einer einzigen Verbrennungsstelle und zweier Paare von Absorptionsapparaten eine erkleckliche Anzahl von Analysen in einigen Stunden zu bewältigen imstande ist.

Aus den Erfahrungen, die bei vielen Hunderten solcher C-H-Bestimmungen gemacht wurden, ließen sich nachstehende Gesetzmäßigkeiten ableiten:

a) Der Einfluß der Substanzmenge auf den Erfolg der Analyse ist unmerklich, d. h. es ist ziemlich gleichgültig, ob wir 7, 10 oder 13 *mg* verwenden; wohl aber hängt dieser Erfolg von dem Zusammentreffen einer größeren Anzahl von Bedingungen ab, die alle gleichzeitig erfüllt sein müssen, wenn die Analyse stimmen soll.

b) Trifft eine einzige dieser erforderlichen Bedingungen nicht zu, so muß sich dieses sofort in einem fehlerhaften Resultat kundgeben; man fin-

det daher, wenn man von Wägungsfehlern, Verlusten oder nachträglichen Verunreinigungen der gewogenen Substanz absieht:

Zu wenig Wasserstoff:

1. wenn nicht alles Wasser mit dem erhitzten Reiter in das Innere des Chlorcalciumrohres hineindestilliert worden ist;

2. wenn die Kautschukverbindung mit dem Schnabel des Verbrennungsrohres rissig geworden ist; es zieht sich dann durch die Kapillarrisse wohl Wasser nach außen, ohne daß gleichzeitig Kohlensäureverluste infolge des verminderten Druckes im Innern auftreten.

Zuviel Wasserstoff:

1. nach unzureichendem Glühen des Rohres;

2. wenn das Chlorcalcium im Kalirohr nicht mehr volle Absorptionsfähigkeit besitzt; man erhält dann, infolge Wasserverlustes des Kalirohres, weil das Wasser bei der zweiten Verbrennung dem Chlorcalciumrohr zugeführt wird, neben zu niedrigem Kohlenstoffwerte einen höheren Wasserstoffwert;

3. bei nicht genügend festgestopften Glaswollpfropfen vor dem Schnabel der Verbrennungsröhre kann Bleisuperoxyd in das Röhrchen gelangen;

4. infolge unreiner Verbindungsschläuche oder Kautschukverschlüsse;

5. infolge mangelhafter Wasserabsorption im U-Rohr mit Blasenzähler.

Zu wenig Kohlenstoff:

1. durch Verunreinigung des Kalirohrs vor der Verbrennung, namentlich durch feinste Quecksilbertröpfchen;

2. durch Unbrauchbarwerden des Chlorcalciums im Kalirohr, wodurch gleichzeitig der Wasserstoffwert erhöht wird;

3. infolge zu hohen Erhitzens des Bleisuperoxyds bei der vorausgehenden Verbrennung und Bindung von Kohlensäure durch das entstandene Bleioxyd;

4. infolge mangelhafter Aneinanderfügung der Apparate, so daß freie Kautschukoberflächen dem Gasstrom dargeboten werden.

Zuviel Kohlenstoff:

1. wenn das Kalirohr unterkühlt auf die Wage gelangt — ein äußerst seltener Fall, der aber vorgekommen ist;

2. eine zur vollständigen Absorption saurer Oxyde des Stickstoffs nicht hinreichende Temperatur des Bleisuperoxyds;

3. wenn das Kalirohr nach der Verbrennung in verunreinigtem Zustand, z. B. durch feinste Quecksilbertröpfchen, gewogen wird.

c) So erklärt sich die beobachtete Tatsache, daß, wenn man alles auf das sorgfältigste zusammengestellt hat und bei der Ausführung der Analyse richtig vorgeht, ganze Serien von hintereinander ausgeführten Verbrennungen vorzügliche Resultate liefern, d. h. noch kleinere Abweichungen als 0·2% zeigten, während ein andermal reihenweise Mißerfolge zu verzeichnen waren, bis der ursächliche Fehler aufgefunden und behoben wurde. Bei der alten Methode war es ja auch nicht anders.

Daraus ergibt sich aber die unter allen Umständen zu beobachtende Regel, daß man vor Beginn einer jeden Serie von Verbrennungen mit der Analyse einer absolut reinen Substanz zu beginnen hat, um zu prüfen, ob sämtliche erforderlichen Bedingungen getroffen und ob der schädliche Einfluß der wichtigsten Quelle von Versuchsfehlern, das ist der Experimentator selbst, durch entsprechende Übung und Umsicht auf das notwendige Minimum herabgedrückt ist. Zu diesem Zwecke verwende ich je nach der Substanz, die verbrannt werden soll, entweder Naphtalin (bei nur C, H und O enthaltenden) oder Leuzin (bei N-, S- und halogenhaltigen) und pflege die Reihe der durchgeführten Verbrennungen unbekannter Körper wieder mit einer Probeanalyse zu beschließen. Diese „Blockierung" erteilt den gefundenen Zahlen vollste Verläßlichkeit.

Daher ist auch dem Anfänger, der sich dieses Verfahren zu eigen machen will, zu raten, sich zuerst mit der Wage, der Wägung der Substanz und der Absorptionsapparate und der Bestimmung des Absorptionsganges des Kalirohres gründlich vertraut zu machen und schließlich, ohne vor den anfänglichen Schwierigkeiten zurückzuschrecken, ein und dieselbe Substanz, Naphtalin oder Leuzin, so lange zu verbrennen, bis nicht etwa nur eine, sondern eine Reihe von mindestens vier oder fünf aufeinanderfolgenden Analysen innerhalb der erlaubten Fehlergrenzen stimmen. Der Aufwand an Sorgfalt, Geduld, Ausdauer und Umsicht, der dabei notwendig war, wird reichlich durch die späteren Erfolge an anderen reinen Substanzen entschädigt.

2. Die mikrogasometrische Stickstoffbestimmung (Mikro-Dumas).

Den ersten Versuchen in dieser Richtung lag das ursprüngliche *Dumas*sche Prinzip zugrunde, wobei in einer einerseits geschlossenen Verbrennungsröhre durch Erhitzen von Magnesit Kohlendioxyd erzeugt wird. Ohne das Verfahren näher beschreiben zu wollen, sei hier bemerkt, daß mit demselben bei einer überaus großen Anzahl von Körpern höchst befriedigende Resultate erreicht wurden. Nur beim Glycyl-alanin ergab diese Methode um zirka 1·5% zu niedrige Stickstoffwerte. Die sorgfältigen Bemühungen, die Ursache dieses Defizits zu ermitteln, ergaben, daß bei fortwährender Entwicklung von Kohlendioxyd durch dauerndes Erhitzen des Magnesits mit einem in diesem besonderen Falle notwendigen dritten Brenner erst die richtigen Zahlen erhalten werden konnten. Da aber die Anwendung eines dritten Brenners nicht meinen Voraussetzungen für die

Ausbildung einer einfachen Methode entsprach, entschloß ich mich, statt dieser Kohlendioxydquelle einen *Kipp*schen Apparat zu verwenden, mit dem es möglich war, von allen bisher untersuchten Substanzen richtige Stickstoffwerte zu ermitteln.

Der Kippsche Apparat zur Entwicklung des Kohlendioxyds.

Diesem ist sowohl bei der Füllung wie später bei der Benutzung eine besondere Aufmerksamkeit zu schenken, denn von ihm hängt hauptsächlich das Gelingen der Analyse ab. Im Laufe der Zeit haben sich folgende Gesichtspunkte als wichtig herausgestellt:

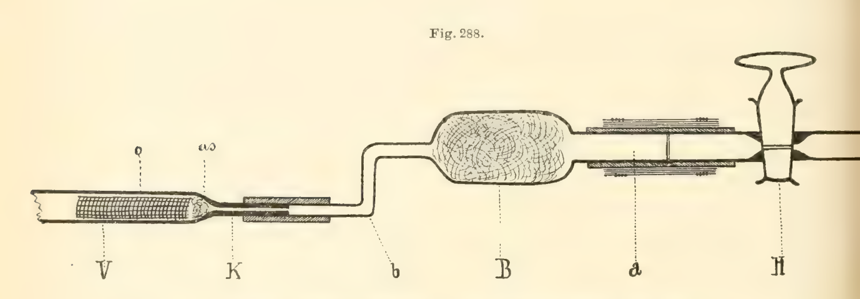
1. Fülle man die Mittelkugel des Apparates ganz voll mit klein geschlagenen Marmorstücken, die vorher sorgfältig unter der Wasserleitung gewaschen und zum Zwecke ihrer Reinigung mit etwas Salzsäure angeätzt worden sind. Man begnüge sich nicht, die Kugel des Apparates etwa nur halbvoll mit Marmorstücken anzufüllen, denn je weniger man davon hineinbringt, desto größer ist der übrig bleibende Luftraum und um so größer die zu befürchtende Fehlerquelle.

2. Darauf fülle man den Apparat mit einem Gemisch von gleichen Teilen reiner (nicht roher) rauchender Salzsäure und Leitungswasser so weit, daß die unterste Kugel davon ganz, und die oberste etwa bis zu einem Drittel oder bis zur Hälfte erfüllt wird. Läßt man nun die Säure in der Mittelkugel nach Öffnen des Hahnes steigen und setzt dadurch die Entwicklung des Kohlendioxyds in Gang, so wird man finden, daß bei noch so oftmaligem Lüften des Apparates stets meßbare Mengen von durch Kalilauge nicht absorbierbaren Gasen im Apparat enthalten sind. Diese anhaftenden Anteile von Luft sind nicht etwa im Marmor zu suchen, sondern in der verdünnten Salzsäure, welche die Bestandteile der Luft gelöst enthält. Daher muß man die Salzsäure sorgfältig nach Zusammenstellung des Apparates dadurch entlüften, daß man von der oberen Kugel aus ein haselnußgroßes Marmorstück hineinfallen läßt, welches dabei reichlich Kohlendioxyd entwickelt und dadurch die letzten Anteile von Luft aus der Salzsäure entfernt. Wenn man später durch wiederholtes, 5—10maliges Öffnen und Schließen des Hahnes die Kohlensäureentwicklung stürmisch vor sich gehen läßt, so hat der Apparat jene Eigenschaften erhalten, welche für das Gelingen der Analyse erforderlich sind. Läßt man nämlich aus einem so vorbereiteten Apparat in das mit 50%iger Kalilauge gefüllte Mikroazotometer Blase für Blase eintreten, so verschwinden diese in der Lauge bis auf einen eben kaum noch sichtbaren Rest; wenn man ihren Durchmesser schätzungsweise auf $^1/_{10}$ *mm* veranschlagt, so ergibt eine einfache Rechnung, daß viele Tausende solcher Blasen erforderlich sind, um das Volumen von 0·01 $cm^3 = 10\ mm^3$, also die letzte am Mikroazotometer überhaupt ablesbare Größe zu geben.

Größere Schwierigkeiten und Mißerfolge bereitete die Zuleitung dieses Gases zu dem Verbrennungsrohr. Anfänglich verwendete ich dazu einen

Kautschukschlauch, der mit einem Quetschhahn zum Zwecke der feineren Regulierung versehen war. Es stellte sich dabei heraus, daß, wenn dieser Schlauch tagelang unter Kohlensäuredruck gestanden hat, man damit ganz richtige Werte bei der Stickstoffbestimmung zu erhalten vermochte, während neue Schläuche im Anfang ihres Gebrauches unerwartet große Gasmengen abgaben und daher ständig ein Zuviel an Stickstoff bei den Analysen ergaben. Aus diesem Grunde verwende ich den Kautschuk dazu, um die fest aneinander gebrachten Glasteile luftdicht zu verbinden. Zwischen dem Hahn *(H)* des *Kipp*schen Apparates und dem Verbrennungsrohr verwende ich ein gläsernes Verbindungsstück (Fig. 288), welches einerseits aus dem Glasrohr *(a)* besteht von der gleichen Dimension wie der Hahn des *Kipp*schen Apparates und andrerseits aus einem entsprechend bajonettförmig gebogenen Glasrohr *(b)* von dem Durchmesser des hinteren Endes der Verbrennungsröhre *(V)*. Der zwischen beiden befindliche Anteil *(B)* ist birnförmig

Fig. 288.



Verbindung zwischen *Kipp*schem Apparat und dem Verbrennungsrohr.
H Hahn des *Kipp*schen Apparates. *a* Ansatzstück gleicher Dimension. *B* birnförmige Erweiterung, gefüllt mit Glaswolle und Natriumbikarbonat. *b* Bajonettröhrchen. *K* Kapillares Ende des Verbrennungsrohres. *as* Seidenasbest gestopft. *o* oxydierte Kupferspirale.

aufgeblasen, wie aus der Abbildung ersichtlich ist, und hernach mit Glaswolle gefüllt. Auf diese Glaswolle wird von dem weiteren Röhrenende aus eine Suspension von Natriumbikarbonat abfiltriert und die letzten flüssigen Anteile durch scharfes Ansaugen mit der Pumpe entfernt. Man erhält dadurch im birnförmigen Zwischenstück einen feuchten Niederschlag von Natriumkarbonat auf der Glaswolle, welcher das Hinüberdringen von Salzsäurenebeln aus dem *Kipp*schen Apparat verhindert. Dieses Glasstück wird nun an den Glashahn des *Kipp*schen Apparates mit einem entsprechend dimensionierten stärkeren, zuvor innen mit Glyzerin befeuchteten Kautschukschlauch angesteckt, so daß Glas an Glas in unmittelbarer Berührung sich befinden und zweckmäßigerweise mit mehreren Lagen eines stärkeren Papierstreifens umwickelt und fest gebunden. Durch diese Maßnahme sichert man die horizontale Richtung des bajonettförmigen Endes und durch Drehen dieses Stückes gegenüber dem Hahn kann man diesem Ende eine ver-

schiedene Höhe oberhalb der Tischplatte erteilen, was bei den oft im Laufe der Zeit sich krümmenden Verbrennungsröhren sehr erwünscht ist.

Die fünfzigprozentige Kalilauge.

Für das Gelingen einer gasometrischen Ablesung über 50%iger Kalilauge ist es unbedingtes Erfordernis, daß das Niveau derselben absolut schaumfrei ist. Auch aus den besten Handelssorten bereitete Laugen entsprechen dieser Anforderung nicht. Endlich ist es mir gelungen, ein Verfahren zu finden, nach welchem eine 50%ige Kalilauge mit den erforderlichen Eigenschaften gewonnen werden kann:

200 *g* Kaliumhydroxyd in Stangen (von *Merck*) werden in 198 cm^3 Wasser zur Lösung gebracht und hierauf 2 cm^3 einer heißen konzentrierten Baryumhydroxydlösung zugesetzt. Nach dem Umschütteln lasse man $^1/_4$ Stunde stehen, um die Hauptmenge des ausgeschiedenen Baryumkarbonats sich absetzen zu lassen und filtriert hierauf durch einen Trichter, in dessen Schaft man ein Bäuschchen Seidenasbest gebracht hat, indem man die zuerst abgelaufenen Portionen so lange wieder aufgießt, bis man ein vollkommen wasserklares Filtrat erhält. Die so erhaltene Kalilauge wird in mit Gummistopfen verschlossenen Flaschen aufbewahrt.

Das Mikroazotometer (Fig. 289).

Seine Konstruktion geht ohne weiters aus der Abbildung hervor. Der mit Teilung versehene Anteil, der sich unter dem Hahn befindet, besitzt eine Länge von 10—11 *cm* und ist vom angeschlossenen Hahn angefangen mit Quecksilber aufs genaueste von halbem zu halbem bis zu 2·5 cm^3 kalibriert. Die Unterabteilungen sind auf der Teilmaschine hergestellt und je ein Teilstrich wertet $^1/_{20}\ cm^3 = 0·05\ cm^3$. Da es für den Geübten leicht ist, Zehntel zu schätzen, so ist es hier selbst für den Ungeübten mit der größten Sicherheit möglich, durch Schätzung noch 0·01 cm^3 genau abzulesen.

Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß es sich schon bei den anfänglichen Versuchen herausgestellt hat, daß sämtliche Stickstoffbestimmungen bei den verschiedensten Substanzen und den verschiedensten Mengen derselben um $^1/_{10}$ des gesamten Betrages zu hoch waren. Die Erklärung ergab sich zum Teil aus dem Umstande, daß die 50%ige Kalilauge als visköse Flüssigkeit die innere Oberfläche der kalibrierten Röhre mit einer Schichte von gewisser Dicke benetzt, zum anderen Teil aus gewissen unvermeidlichen Einflüssen, auf welche hier nicht näher eingegangen werden soll, als daß sie bei sonst gleichen Bedingungen, insbesondere gleichem Tempo der N-Entwicklung, der N-Menge, bei allen untersuchten Substanzen und den verschiedensten Mengen derselben streng proportional sind. N-freie Körper entbinden unter denselben Bedingungen ein Gasvolumen, welches mit dem Mikroazotometer nicht mehr gemessen werden kann.

Fig. 289.



Maz Mikroazometer. *B* Kalibirne.

Um daher das wahre N-Volumen aus dem abgelesenen zu finden, subtrahiert man davon den 10. Teil, z. B :

abgelesen	. 0·76 *cm*³
der zehnte Teil .	. 0·076 „
wahres N-Volumen	. 0·684 *cm*³

und entsprechend der mathematischen Gepflogenheit bei Zahlenangaben nur die letzte Stelle unsicher zu lassen, wird das wahre N-Volumen mit drei Dezimalen angegeben und in Rechnung gesetzt.

Die besprochene Korrektur, welche auch durch die Adhäsion der 50%igen Kalilauge an der Glasoberfläche begründet ist, ist demnach bei dem Apparat eine Funktion der Mantelfläche jenes Zylinders, den das Gas in der Röhre einnimmt. Man sollte demnach meinen, daß bei Apparaten mit etwas anderem Kaliber auch

diese Korrektur eine andere sein müsse. Die mathematische Berechnung hat aber ergeben, daß die Mantelflächen zweier Zylinder mit je 1 cm^3 Inhalt und einer Länge von einmal 37 *mm* und das andere Mal von 43 *mm* nahezu die gleiche Korrektur bedingen.[1] Ich habe auch Gelegenheit gehabt, mehrere Mikroazotometer verschiedenen Kalibers auf das genaueste, durch Ausführung einer größeren Anzahl von Leuzinanalysen zu prüfen, und konnte überall bestätigt finden, daß die Subtraktion des 10. Teils vom abgelesenen Volumen das wahre N-Volumen ergeben hat.

Für den Gebrauch richte man sich das vollkommen rein gewaschene und mit Chromsäure-Schwefelsäuregemisch sorgfältig gereinigte, mit Wasser und Alkohol ausgespülte und an der Pumpe getrocknete Mikroazotometer folgendermaßen her: An die horizontalgerichtete, etwas höher gelegene kurze Tubulatur wird ein langer, gut ausgewaschener und nachher durch Ausschwenken getrockneter langer Kautschukschlauch angesteckt, an dessen freiem Ende die Glasbirne für die Kalilauge befestigt wird. Diese besitzt außer einer seitlichen Tubulatur noch zwei Auftreibungen, wodurch sie jederzeit auf den Tisch gelegt werden kann, ohne zu rollen. Der Hahn des Mikroazotometers wird mit einer Spur Vaselin gefettet. Sogenanntes Pumpenfett ist unbrauchbar, denn es erteilt nach kurzer Verwendung der Kalilauge wieder die Fähigkeit, Schaum zu bilden. Nun füllt man von der Birne aus so viel Quecksilber ein und lasse es durch zweckentsprechendes Heben in das Mikroazotometer hineingleiten, daß es bei Vertikalstellung des Apparates bis knapp unter die horizontale Tubulatur mit seinem Niveau reicht. Nun füllt man die 50%ige Kalilauge ebenfalls von der Birne aus portionenweise ein, bis man so viel davon eingebracht hat, daß das Niveau der Kalilauge bei offenem Hahn des Apparates und hochgehaltener Birne einerseits bis in den Trichter des Apparates und andrer-

---

[1]) Die Berechnung ergibt folgende Werte:

h in *mm*	37	40	43
r „ „	2·933	2·821	2·721
2r „ „	5·866	5·642	5·442
M = 2r π h in mm^2	681·87	709·00	735·16
Korrektur K	0·09617	0·1000	0·10369
Faktor f = (1—K)	0·90383	0·9000	0·89631
Dem abgelesenen Gasvolumen von 1·00 cm^3 entspricht demnach ein wahres N-Volumen von	0·90383 cm^3	0·9000 cm^3	0·89631 cm^3
Ein Körper mit dem wahren Gehalte von 9·00% N wird in den drei Apparaten folgende Werte ergeben	9·04%	9·00%	8·96%

Man sieht also, daß die Differenz dieser Werte für den praktischen Chemiker gleich Null gesetzt werden muß. Überdies ist es gegenwärtig der Firma *Eger* in Graz gelungen, die Apparate so zu konstruieren, daß alle Instrumente das Volumen von 1 cm^3 in einer Länge der Meßröhre von nahezu genau 40 *mm* fassen, wodurch der vorher erwähnte günstigste Fall praktisch erreicht ist.

seits bis in den verjüngten Teil der Glasbirne hineinreicht. Das so beschickte Mikroazotometer kann in diesem Zustande wochenlang bereit stehen bleiben; die Füllung mit Kalilauge genügt für 12 Bestimmungen.

Vorbereitung und Ausführung der Stickstoffbestimmung.

Die zu untersuchende Substanz füllt man in kleine Wägegläschen ein, die eine (Fig. 290) Länge von 4 *cm* und eine am abgeschmolzenen Ende etwa 3 *mm* und an ihrem schräg abgesprengten offenen Ende 5 *mm* betragende Weite haben und bringt das Ganze, nachdem man das gefüllte Wägegläschen außen sorgfältig mit Gaze abgewischt hat, mit Hilfe eines aus Aluminiumdraht gefertigten kleinen Bänkchens auf die Wage (s. Fig. 277), wartet $^1/_2$—1 Minute, bis das durch Abwischen erwärmte Wägegläschen die gewünschte Gewichtskonstanz erreicht hat und bestimmt endlich das Gewicht. Nun ergreift man das Wägegläschen mit Zeigefinger und Daumen der linken Hand an seinem offenen Ende, nimmt es von der Wage und faßt es mit Hilfe eines mehrfach zusammengelegten Gazelappens mit den ersten drei Fingern der rechten Hand, um daraus die für die Analyse notwendige Substanzmenge in das Mischröhrchen durch entsprechendes Ausklopfen bei gleichzeitigem Drehen abzufüllen. Man wird durch Übung lernen, eine Menge von 4—8 *mg* Substanz durch Ausklopfen zu entfernen; sowohl kleinere als größere Mengen sind aus verschiedenen Gründen nicht empfehlenswert. Hierauf bringt man das Röhrchen wieder in seine ursprüngliche Lage auf die Wage und bestimmt sein Gewicht wie zuvor.

Fig. 290.

Wägegläschen zum Abwiegen der Substanz mit Verschlußstoppel (nat. Größe).

Die Mischröhrchen sind Reagenzgläschen von (Fig. 292, *M*) 9 *mm* Durchmesser und 8 *cm* Länge, die mit einem tadellos allseits schließenden glatt geschnittenen Kork verschlossen sind.

Nun schreitet man an die Füllung des Verbrennungsrohres. Dieses besteht aus einer Jenaer Hartglasröhre (Fig. 292, *V*) von 25 *cm* Länge bei einem äußeren Durchmesser von 8 *mm*, welche einerseits offen und in der Flamme abgelaufen, und am anderen Ende zu einer 3 *cm* langen und 4—5 *mm* im äußeren Durchmesser messenden Kapillare ausgezogen ist (Fig. 288, *k*). Die gesamte Länge des Verbrennungsrohres beträgt demnach 28—30 *cm*. Vor der ersten Verwendung schiebt man durch das Rohr bis zur Kapillare ein Bäuschchen Seidenasbest und auf dieses eine in das Rohr streng hineinpassende, $2^1/_2$ *cm* lange Spirale von Kupferdrahtnetz *(O)* bis zum Asbestpfropfen. Beide verbleiben dauernd in dem so hergerichteten Rohre.

Für die Beschickung des Rohres sind zwei Qualitäten von Kupferoxyd erforderlich. Als grobes Kupferoxyd verwende ich das feine drahtförmige Kupferoxyd von *Kahlbaum*, dessen etwas zu lange Stücke für die beschriebene Röhrendimension durch Zerdrücken in einer Reibschale ein für allemal gekürzt worden sind. Als feines Kupferoxyd, mit dem die Sub-

stanz gemischt werden soll, verwende ich ein feinblättriges, durch Aussieben von Kupferhammerschlag gewonnenes Präparat. Dieses hat unbedingt große Vorzüge gegenüber dem feinpulverigen Kupferoxyd des Handels, erstens weil es den Durchtritt der Gase auch ohne Rinne stets gestattet und zweitens, weil es eine geringere Menge von Luft an seiner Oberfläche absorbiert erhält wie jenes.

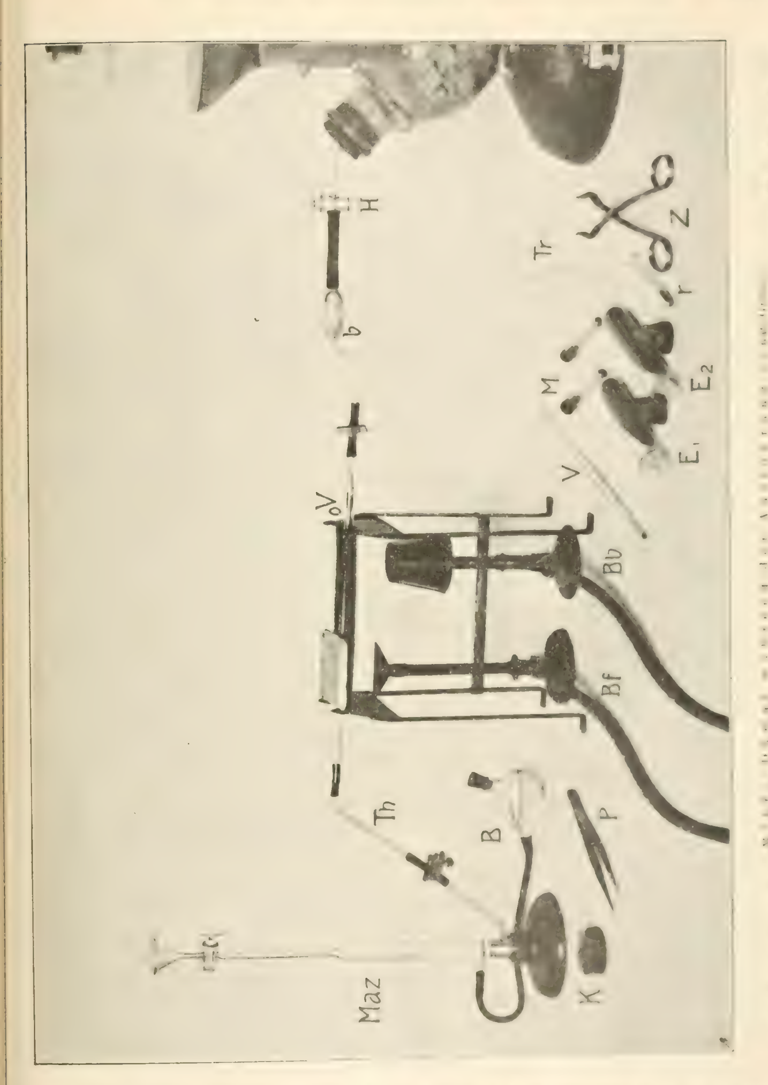
Vor jeder Analyse bringt man in das Verbrennungsrohr, nachdem es zuvor nur mit einem an einem Eisendraht aufgewickelten Wattebauschchen ausgewischt worden, auf die darin befindliche Kupferdrahtnetzrolle eine Schicht von 2 *cm* groben Kupferoxyds, hierauf eine Schicht feinen Kupferoxyds von $^1/_2$—1 *cm* Länge, das durch Schöpfen mit dem offenen Ende des Rohres aus den großen Eprouvetten, in welchen man sich die beiden Sorten des geglühten Kupferoxyds bereit hält, eingebracht wird. Nun setzt man den Fülltrichter (Fig. 291) aufs Rohr, der durch Ausziehen einer gewöhnlichen Eprouvette bis auf einen Durchmesser von 5 *mm* hergestellt wird, und bringt in das Mischröhrchen durch Schöpfen soviel von feinem Kupferoxyd ein, daß es eine Höhe von etwa 5—8 *mm* darin einnimmt. Nach dem Aufsetzen des Korkes wird sorgfältig bis zur gleichmäßigen Verteilung geschüttelt und unter Drehen und fortwährendem Klopfen der Kork entfernt. Den Inhalt des Mischröhrchens lasse man nun durch den Fülltrichter in die Verbrennungsröhre hineingleiten, schöpfe mit dem offenen Mischröhrchen etwa die Hälfte der früher genommenen Menge Kupferoxyd, verschließe es neuerlich mit dem Kork und bringe alle im Innern des Röhrchens etwa noch anhaftenden Substanzteilchen durch Schütteln in innige Mischung mit dem Kupferoxyd, welches ebenso durch den Fülltrichter neuerlich in das Verbrennungsrohr eingebracht wird. Diesen Vorgang wiederholt man noch ein drittes Mal, worauf man sicher sein kann, daß alle bei der Differenzwägung bestimmte Substanz in das Verbrennungsrohr hineingelangt ist. Bei der beschriebenen Art der Füllung wird die nun im Verbrennungsrohr befindliche Schicht von feinem Kupferoxyd eine Länge von etwa 3—4 *cm* haben. Durch Schöpfen von grobem Kupferoxyd mit der Verbrennungsröhre füllt man eine Schicht von etwa 7 *cm* ein und bringt darauf eine 2—$2^1/_2$ *cm* lange, ins Rohr leicht passende reduzierte Kupferdrahtnetzrolle ein. Das mit einer Tiegelzange (*Z*) gehaltene Kupferdrahtnetzröllchen (*r*) wird in einem Bunsenbrenner zum gleichmäßigen Glühen erhitzt und in ein Reagenzgläschen fallen gelassen, in dem sich 3 Tropfen Methylalkohol oder Äthylalkohol befinden. Ein so behandeltes Röllchen kann für mindestens 10 Bestimmungen Verwendung finden, bevor es wieder reduziert werden muß. Vor völligem Auskühlen des Röllchens entfernt man es aus dem Reagenzgläschen, um die letzte Spur von anhaftendem Alkohol, die beim Versuch die Tension der Kalilauge zu ändern fähig wäre, abdunsten zu lassen und bringt es hierauf auf das grobe Kupferoxyd im Verbrennungsrohr. Nun verschließt man dieses mit dem zum Mikro-


Fig. 291.
Fülltrichter.

azotometer passenden, winklig gebogenen Thermometerrohr *(Th)* mittelst eines mit Glyzerin oder Wasser befeuchteten Kautschukschlauches und steckt das kapillar ausgezogene Ende des Verbrennungsrohres so an das bajonettförmige Ende *(b)* des Zwischenstückes am *Kipp*schen Apparat, daß innerhalb dieser Schlauchverbindung Glas an Glas fest sitzen.[1]) Das Verbrennungsrohr *(V)* lagert man derart auf das Verbrennungsgestell, daß die eine, dem eintretenden Gasstrom näher gelegene Seitenwand desselben mit dem an das grobe Kupferoxyd anschließenden Ende der oxydierten Spirale *(O)*, die andere Seitenwand ungefähr mit dem freien Ende der reduzierten Kupferspirale *(z)* zusammenfällt. Nun öffnet man den Hahn des *Kipp*schen Apparates und läßt erst einen energischen Strom von Kohlensäure durchstreichen. Nach fünf Minuten verbindet man das im Verbrennungsrohr stehende, winklig gebogene Termometerrohr mit Hilfe eines mit Glyzerin innen ausgewischten, 3 *cm* langen Kautschukschlauchstückes mit dem ebenfalls winklig aufgebogenen Gaseinleitungsrohr des Mikroazotometers *(Maz)*, nachdem man zuvor durch Öffnen des Hahnes an demselben die Kalilauge sich hat in die Birne völlig entleeren lassen. In dieser Zeit hat man auch die letzten in dem ganzen System befindlichen Gasreste mit Kohlensäure ausgespült. Nach Drosselung[2]) des Hahnes am *Kipp*schen Apparat und Heben der Kalibirne füllt man diese in gewöhnlicher Weise wieder mit Kalilauge und läßt nach dem Senken der Birne *(B)* Blase für Blase langsam eintreten. Wie schon früher auseinandergesetzt, soll nun jede Blase bis auf einen eben kaum noch sichtbaren Rest in der Lauge verschwinden. Hierauf kann mit der Verbrennung begonnen werden. Ist dies jedoch innerhalb dieser Zeit nicht zu erzielen, so fährt man mit der Durchleitung von Kohlendioxyd weiter fort, bis der erwähnte Zustand erreicht ist, oder bemüht sich, die anderweitigen Gründe dieses Mißerfolges festzustellen und zu beseitigen. Hat man es erreicht, daß die eintretenden Kohlendioxydblasen bis auf einen kaum sichtbaren Rest in der 50%igen Lauge verschwinden, so drosselt man, um mit der Verbrennung beginnen zu können, den Hahn des *Kipp*schen Apparates fast vollständig und stellt die Flamme des Flachbrenners *(Bf)* unter die reduzierte Kupferspirale und das angrenzende grobe Kupferoxyd, welchen Teil der Röhre man zweckmäßigerweise durch ein am Verbrennungsgestell angebrachtes Drahtnetz vor zu starker Erhitzung schützt. Überdies bedeckt man diese Teile der Röhre von oben her mit einer 7 *cm* langen und 5 *cm* breiten Platte aus Asbestpappe oder Eternit. Beginnt man mit der Erwärmung des Rohres noch bei geöffnetem Mikroazotometer, wie wir anfänglich verfuhren, so kann man bei neuen Röhren allerdings richtige Resultate erhalten. Da aber in öfter gebrauchte Röhren leicht Anteile der zu verbrennenden Substanz auch im vorderen Abschnitt des rauh gewor-

[1]) Auf die Verwendung der in der Abbildung ersichtlichen Quetschhähne verzichte ich in letzter Zeit vollkommen.

[2]) Ist der Durchmesser der Verbrennungsröhre größer als 8 *mm*, so schließe man den Hahn vollständig.



denen Rohres haften bleiben, fallen darin die Bestimmungen oft zu niedrig aus, und es ist daher notwendig, die Erhitzung dieses Rohrenabschnittes in

die Austreibungsperiode des Stickstoffes einzubeziehen, wie es hier angegeben ist. Die etwa noch am Kupferoxyd absorbierte Luft fällt dann praktisch nicht mehr ins Gewicht. Ist der vordere Rohrabschnitt nach etwa einer Minute ins Glühen gekommen, so stellt man den zweiten mit Schornstein versehenen gewöhnlichen Bunsenbrenner *(Bb)*, dessen Flamme eben nicht leuchtend eingestellt ist, an das äußerste Ende des Verbrennungsgestelles unter das grobe Kupferoxyd vor der oxydierten Kupferdrahtnetzspirale. Sobald die Gasentwicklung abzunehmen beginnt, rückt man um einige Millimeter vor und je näher man der Mischung der Substanz kommt, um so geringere Stellungsänderungen des Brenners darf man vornehmen, wenn man nicht Gefahr laufen will, eine zu stürmische Entbindung von Gasen zu bewirken. Es hat sich als Erfahrungstatsache herausgestellt, daß eine Verbrennung dann richtig geleitet ist, wenn sich im weiten Teil des Mikroazotometers während des Entweichens von Stickstoff jeweils 3, höchstens 5 Gasblasen gleichzeitig unterwegs befinden. Ist man in dieser Weise das ganze Rohr entlang mit diesem Brenner *(Bb)* bis an den Flachbrenner *(Bf)* herangekommen und hat die Gasentwicklung einen fast völligen Stillstand erreicht, so bringt man den ersteren Brenner in seine ursprüngliche Lage unter das an das oxydierte Kupferröllchen angrenzende grobe Kupferoxyd und schiebt nun den Flachbrenner so gegen diesen, daß nun auch die ganze Länge des feinen Kupferoxyds gleichmäßig und gleichzeitig von dieser Flamme ins Glühen gebracht wird. Es handelt sich jetzt eben darum, die letzten, etwa noch nicht völlig verbrannten Reste der endgültigen Oxydation zuzuführen. Nun erst öffnet man den Hahn des *Kipp*schen Apparates, so zwar, daß etwa höchstens 5—8 Blasen sich gleichzeitig im Mikroazotometer unterwegs befinden und setzt die Ausspülung des Verbrennungsrohres mit Kohlendioxyd so lange fort, bis die aufsteigenden Gasblasen plötzlich klein werden und die Kleinheit wie vor Beginn des Versuches erreichen. Nun entfernt man die Brenner durch Vorziehen und löst die Schlauchverbindung zwischen Mikroazotometer und dem winklig gebogenen Thermometerrohr, wobei der Schlauch am Mikroazotometer zu bleiben hat. Wenn die bei der Herrichtung dieses Meßapparates eingefüllte Quecksilbermenge richtig gewählt ist, so hat man nicht zu befürchten, daß auch bei tiefgestellter Kalikugel äußere Luft in den Apparat eintritt, daher ist die Anbringung eines Quetschhahnes an diesem Schlauchstück völlig überflüssig. Das abgenommene Mikroazotometer stellt man neben ein Thermometer und liest nach einer halben, längstens einer Minute bei hochgehobener Kalikugel und Gleichheit der Niveaus bei vertikaler Stellung der Meßröhre und unter Vermeidung der Parallaxe sowohl im durchfallenden, vielleicht sogar noch besser im auffallenden Licht den Stand des tiefsten Punktes des Laugenmeniskus mit einer Genauigkeit von 0·01 cm^3 ab.

Die Zeitdauer einer derartigen Stickstoffbestimmung betreffend, ist zu bemerken, daß, wie aus dem früher Gesagten hervorgeht, für die Entlüftung des Verbrennungsrohres ungefähr 4—5 Minuten, für die Verbren-

nung der Substanz einschließlich der nachfolgenden Ausspülung des Rohres mit Kohlendioxyd 5—8 Minuten erforderlich sind, so daß man für die Zeitdauer einer Stickstoffbestimmung samt Berechnung des Resultates rund $^1/_4$ Stunde veranschlagen kann.

Aus den vielhundertfachen Erfahrungen, die ich im Laufe des verflossenen Jahres gemacht habe, möchte ich hier über einige Fehlerquellen, welche das Resultat in schädlicher Weise zu beeinflussen imstande sind, besonders hingewiesen haben.

Man findet zu hohe Stickstoffwerte:

1. wenn der *Kipp*sche Apparat nicht völlig entlüftet ist;

2. wenn aus dem Verbindungsstück zwischen *Kipp*schem Apparat und Verbrennungsröhre sowie auch aus letzterer die Luft nicht hinreichend durch Kohlendioxyd verdrängt worden ist; dabei sei besonders darauf hingewiesen, daß das feine Kupferoxyd des Handels eine viel größere Absorption für Gase zeigt, als das von mir verwendete feinblätterige Kupferoxyd aus gesiebtem Kupferhammerschlag;

3. wenn der Hahn des Mikroazotometers nicht sorgfältig mit einer dünnen gleichmäßigen Schichte von Vaselin überzogen und so in seine Hülse eingedrückt ist, daß er glänzt, kann es vorkommen, daß Kalilauge aus dem Trichter des Apparates in die kalibrierte Röhre eindringt und im verjüngten Teil derselben knapp unter dem Hahn haften bleibt und Gas verdrängt. Der dadurch bedingte Fehler kann je nach der Form dieses Teiles bis zu 0·04 cm^3 betragen. Durch Heben der Birne und vorsichtiges Öffnen des Hahnes läßt sich die eingedrungene Kalilauge daraus wieder verdrängen und die Analyse vollends retten;

4. bei zu rasch geleiteter Verbrennung, wo in seltenen Fällen bei manchen Körpern Kohlenoxydgas oder andere, durch Kalilauge nicht absorbierbare gasförmige Verbrennungsprodukte über das glühende Kupferoxyd hinweg in das Mikroazotometer hineingelangen und so einen zu hohen Stickstoffgehalt vortäuschen können.

Der gefundene Stickstoffwert kann fälschlich zu niedrig ausfallen:

1. wenn der durch die Verbrennung vollständig entbundene Stickstoff am Ende der Verbrennung durch die nachgeschickte Kohlensäure nicht vollständig ausgetrieben wird;

2. bei unvollständiger Verbrennung der Substanz infolge nicht hinreichenden und gleichmäßigen Glühens des Rohres;

3. in ganz seltenen Fällen, wenn es zur Bildung schwerst verbrennlicher Stickstoffkohle kommt. In solchen Fällen kann folgender Kunstgriff Abhilfe schaffen: bei der Füllung des Rohres lasse man auf die oxydierte Kupferspirale zuerst einen Kristall Kaliumchlorat fallen [1] und fülle es darauf in der früher angegebenen Weise. Nach vollzogener Verbrennung und bevor man mit Kohlendioxyd die Stickstoffreste aus dem Rohr entfernt, entwickelt man mit Hilfe eines dritten Brenners aus dem Kaliumchlorat Sauerstoff.

---

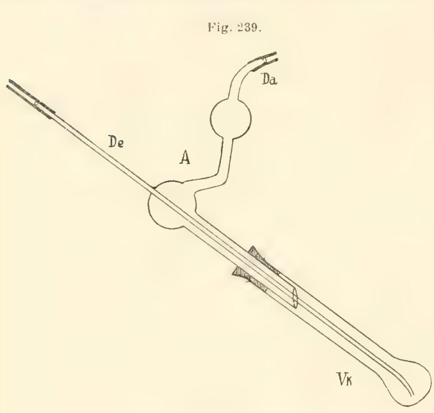
[1]) Siehe darüber *Holdermann* und *Scholl*, Ber. 43. S. 343.

wodurch alles während der Verbrennung reduzierte Kupfer sowie die abgeschiedene Kohle völlig oxydiert werden. Bei vorsichtiger Ausführung besteht keinerlei Gefahr, daß elementarer Sauerstoff in das Mikroazotometer gelangt, weil die glühende reduzierte Kupferspirale, an der man ein querschnittweises Fortschreiten der Oxydation mit freiem Auge wahrnehmen kann, diesen Übertritt völlig sicher verhindert.

3. Bestimmung des Stickstoffs nach Kjeldahl in kleinen Substanzmengen (Mikro-Kjeldahl).[1]

Die für die Bestimmung zu verwendende Substanz wird ebenso, wie schon bei *Mikro-Dumas* beschrieben, in Wägegläschen (Fig. 290) gewogen und in Verbrennungskölbchen (Fig. 293, *Vk*) eingebracht, welche aus Resistenzglas-Eprouvetten gewöhnlicher Dimension durch Anblasen einer kleinen kugeligen Erweiterung an ihren Enden hergestellt worden sind. Nach Zufügen von etwa $^1/_2$—1 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und nach Einbringen von entsprechenden Zusatzmitteln je nach Bedarf (ich gebe gewöhnlich eine Messerspitze Kaliumsulfat und ebensoviel Kupfersulfat hinzu) wird über einer kleinen Flamme der kugelige Anteil des Kolbens zur Erhitzung gebracht. Dazu bedient man sich mit größtem Vorteil des Verbrennungsgestelles, wie wir es bei der Kohlenstoffbestimmung und bei *Mikro-Dumas* verwendet haben, indem man darauf ein entsprechend gebogenes Drahtnetz legt und einen Drahtbügel unter die eine obere Schiene einklemmt, durch welchen die Verbrennungskölbchen in entsprechender Schieflage erhalten werden. Als Heizquelle bedient man sich der beiden äußersten Flammenspitzen eines Flachbrenners, so daß man mit größter Bequemlichkeit auf einem Verbrennungsgestell mit Hilfe von zwei Flachbrennern gleichzeitig 4 Proben erhitzen kann. In der Regel geht die Zersetzung in überraschend kurzer Zeit vonstatten. Wie bekannt ist es auch oft geradezu notwendig, um den

Fig. 239.



Da Ansatz zur Destillationsröhre.

[1] Der Erste, der meines Wissens quantitative Stickstoffbestimmungen nach dem Prinzipe von *Kjeldahl* ausgeführt hat, war *Fritz Pilch:* Monatshefte f. Chemie. 32 (1911). S. 26. Sein Verfahren und die dabei verwendeten Hilfsmittel unterscheiden sich so vielfach von den hier zu beschreibenden, daß ich mich mit der Anführung begnügen darf.

richtigen Wert zu bekommen, längere Erhitzungsdauer anzuwenden und insbesondere dafür zu sorgen, daß elementarer Kohlenstoff in der Schwefelsäure vorhanden ist, welcher durch Zersetzung der letzteren eine beständige Neubildung von Wasser zu veranlassen hat. Zu diesem Ende setzt man, nachdem der Kölbcheninhalt zum erstenmal klar geworden ist, 2—3 Tropfen Alkohol aus einer Spritzflasche zu und setzt die Erhitzung fort. Die mit diesem Alkohol eingebrachte Kohlenstoffmenge genügt, um die notwendige Erhitzungsdauer um 5—10 Minuten zu verlängern. Ist nun der Kolbeninhalt völlig klar geworden, so kann man ohneweiters sofort zum Abdestillieren des gebildeten Ammoniaks schreiten. Die Destillation erfolgt aus dem Verbrennungskölbchen selbst. Man erspart sich dadurch jedes Überfüllen und Nachspülen. Zu diesem Zwecke steckt man das Kölbchen, nachdem man $^1/_2$ *cm*^{3} Wasser eingebracht hat, an den kleinen Glasapparat, der durch die nebenstehenden Abbildungen (Fig. 293 u. Fig. 294) dargestellt ist.

Fig. 294.



Destillation (Mikro-*Kjeldahl*) in Ausführung ($^1/_4$ nat. Größe). *Vk* Verbrennungskölbchen. *A* Destillationsaufsatz. *De* Dampfeinleitungsrohr. *Dr* Destillationsrohre. *E* Erlenmeyerkolben zur Entwicklung von Wasserdampf.

Dieser Apparat besteht aus einem völlig aus Glas gefertigten Destillationsaufsatz, der mittelst eines weitgebohrten Kautschukpfropfens auf das Zersetzungskölbchen (*Vk*) aufgesetzt wird und einer mit Hilfe eines Kautschukschlauchs daran angeschlossenen Destillationsröhre (*Dr*), die bis nahe an die ebene Tischplatte heranreicht. Der Destillationsaufsatz (*A*) besitzt ein Dampfleitungsrohr (*De*), dessen gebogenes Ende, wie aus der schematischen Zeichnung hervorgeht, in der kugelförmigen Erweiterung des

Zersetzungskölbchens *(Vk)* schwach nach abwärts gebogen ist und dessen freies Ende mit Hilfe eines Kautschukschlauches mit einem Erlenmeyerkolben *(E)* rasch verbunden werden kann, in welchem ein kontinuierender Dampfstrom aus kochendem Wasser, dem etwas Zinkstaub zugesetzt ist, entwickelt wird. Die früher erwähnte Destillationsröhre *(Dr)* besteht aus einer Jenaer Hartglasröhre von 45 *cm* Länge und einem äußern Durchmesser von 8 *mm*, dessen oberstes Ende unter einem etwas kleineren als rechten Winkel abgebogen ist. Dieses winklig abgebogene Ende dient zum Anschluß an den Destillationsaufsatz mittelst einer kurzen Schlauchverbindung. Es muß hervorgehoben werden, daß gerade dieses Destillationsrohr *(Dr)* die größte Aufmerksamkeit des Experimentators erfordert, denn es schließt eine beständige Fehlerquelle, das sind die Alkalien des Glases, in sich. Es ist daher notwendig, ein neues Rohr stundenlang der Wirkung von strömendem Wasserdampf auszusetzen, worauf es tadellos gebrauchsfähig wird. Hat man ein derartiges Rohr längere Zeit nicht verwendet, so ist es vor neuerlichem Gebrauch unbedingt erforderlich, das Ausdämpfen zu wiederholen und das Rohr auf seine Reinheit in der Weise zu prüfen, daß man in einem blinden Versuch nach einer 10 Minuten währenden Destillation das Destillat durch Titration untersucht, ob noch Alkalien übergehen.

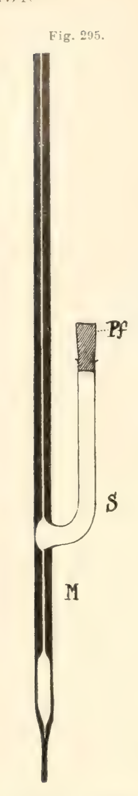
Erwähnen möchte ich, daß sich Röhren aus Zinn, Blei sowie auch aus Silber als Destillationsröhren noch weniger tauglich erwiesen haben, wie die erwähnten Jenaer Hartglasröhren; in jüngster Zeit konnte ich mich überzeugen, daß eine Röhre aus Quarzgut, vollkommen fehlerfrei, überdies gar nicht kostspielig ist.

Für die Titration hat es sich als das Zweckmäßigste erwiesen, $^1/_{70}$-Normallösungen und als Indikator Methylrot (p-Dimethylaminoazobenzol-orthokarbonsäure) Kahlbaum zu verwenden. Folgender Weg hat sich als der beste bewährt: Nach einer mit Hilfe dieses Indikators genau hergestellten $^1/_{10}$-Normalsalzsäure wird eine $^1/_{10}$-Normalnatronlauge gestellt. Nun mißt man in ein 200 *cm*³ fassendes Meßkölbchen 28·6 *cm*³ dieser $^1/_{10}$-Normalsalzsäure, fügt dazu 1—2 Tropfen Indikatorlösung, die man sich durch Lösen eines Überschusses an festem Indikator in 1 *cm*³ $^1/_{10}$-Normalnatronlauge hergestellt hat und füllt bis zur Marke das Kölbchen voll. Ebenso geht man bei der Bereitung der $^1/_{70}$-Normalnatronlauge vor. Es hat demnach die $^1/_{70}$-Normalsalzsäure eine rosenrote, die $^1/_{70}$-Normalnatronlauge eine kanariengelbe Farbe. Zum Titrieren verwende ich enge, 10 *cm*³ im ganzen fassende Büretten mit oder ohne Schellbachstreifen mit Quetschhahneinrichtung. Die Ausläufe bestehen aus engen Glasröhrchen, die auf eine Länge von 5—8 *cm* zu Kapillaren von einem äußeren Durchmesser von 1 *mm* ausgezogen sind. Infolge dieser Einrichtung kann man, da die Büretten in $^1/_{20}$ *cm*³ geteilt sind, mit größter Leichtigkeit denselben sowohl Flüssigkeitsmengen von 0·01 *cm*³ entnehmen, als auch durch Schätzung des Niveaustandes bestimmen. Da 1 *cm*³ einer $^1/_{70}$-Normallösung 0·1 *mg* Stickstoff entspricht, so wäre die letzte durch diese Titration meßbare Stickstoffmenge gleich 0·002 *mg* Stickstoff.

Zur Bestimmung des Stickstoffs fügt man, wie schon erwähnt, das Zersetzungskölbchen an den in einem Stativ eingeklemmten Destillationsaufsatz, läßt die Destillationsröhre in ein kleines, ebenfalls durch Wasserdampf vorbehandeltes Erlenmeyerkölbchen, in dem sich eine gemessene Menge $^{1}/_{70}$-Normalsalzsäure (je nach Bedarf 3—5 cm^3) befindet, eintauchen und setzt in den Kautschukschlauch, welcher die Verbindung zum Dampfentwickler besorgt, ein kleines Trichterchen, durch welches man soviel 33%ige Natronlauge einfließen läßt, bis es zur Ausscheidung von Kupferhydroxyd im Zersetzungskölbchen kommt. Nach Entfernung des Trichters bringt man den Schlauch an den Dampfentwickler und beginnt mit der Destillation, welche etwa 8—9 Minuten so geleitet werden soll, daß das untere Ende des Destillationsrohres in die vorgelegte Säure taucht. Während der ganzen Zeit ist es zweckmäßig, unter die kugelförmige Erweiterung des Kölbchens ein kleines Flämmchen zu bringen, wodurch die Destillation wesentlich erleichtert und beschleunigt wird. Nach dieser Zeit drehe man den ganzen Apparat derartig in der Klemme, daß das Ende des Destillatorrohres nicht mehr in die vorgelegte Säure eintaucht und überlasse während einer weiteren Minute das Rohr der Ausspülung durch die entweichenden Dämpfe. Die Unterbrechung der Destillation erfolgt durch Lösung der Schlauchverbindung mit dem Dampfentwickler. Hierauf spült man das Ende des Destillationsrohres von außen mit der Spritzflasche ab, entfernt es aus dem Verbindungsschlauch des Destillationsaufsatzes, faßt die heiße Röhre an einem Kork, den man aus diesem Grunde daran angebracht hat, bringt es in horizontale Lage und spült es von seinem winklig gebogenen Ende an 2- bis 3mal mit destilliertem Wasser aus. Nun schreitet man zum Titrieren der unverbraucht gebliebenen Säure. Es ist dabei zu bemerken, daß als Endpunkt der Reaktion der Farbenton rein kanariengelb sein muß, wie ihn die $^{1}/_{70}$-Normalnatronlauge schon besitzt. Der Farbenvergleich des Kölbcheninhaltes mit dem Büretteninhalt ist daher eine wesentliche Unterstützung beim Titrieren, welches bei Tageslicht ebenso genau wie beim künstlichen Licht auszuführen ist. Die Multiplikation der bei der Destillation verbrauchten, mit einer Genauigkeit von 2 Dezimalen angegebenen Menge $^{1}/_{70}$-Normalsalzsäure mit dem Faktor 0·2 ergibt das Gewicht der gesuchten Stickstoffmenge.

Es ist zweifellos, daß gerade diese Methode von großem Werte bei Stoffwechseluntersuchungen an kleinen Tieren sein wird. Es erscheint mir daher nicht überflüssig, hier anzuführen, wie genaueste Volummessungen an flüssigen Stoffwechselprodukten, z. B. Harn ausgeführt werden können. Dazu bediene ich mich einer durch die nachstehende Abbildung (Fig. 295) illustrierte Präzisionsauswaschpipette. Der erweiterte Teil faßt von der fein auslaufenden Spitze bis zu einer darüber befindlichen Marke (*M*) ein Volumen von 0·1—0·15 cm^3, welches durch sorgfältige Auswägung mit Quecksilber unter Beobachtung und in Rechnungziehung der Temperatur und Reduktion der Gewichte auf den leeren Raum festgestellt worden ist. Der seitliche Schenkel (*S*) dieser kleinen Pipette ist während des Aufsaugens und Ab-

Fig. 295.



Präzisions-Auswaschpipette (2/3 nat. Größe). *M* Ringmarke. *S* Seitenschenkel. *Pf* Pfröpfchen.

messens der betreffenden Flüssigkeit mit einem kleinen Pfropfen *(Pf)* verschlossen. Indem man den Inhalt der Pipette in das Zersetzungsröhrchen teilweise ausfließen läßt, entfernt man den Pfropfen und bringt, mit Hilfe eines lang ausgezogenen Glasröhrchens, konzentrierte Schwefelsäure auf den Grund der Biegung des seitlichen Schenkels und läßt sie ebenfalls durch die kapillare Spitze dieser Pipette in das Kölbchen auslaufen. Dadurch werden sämtliche bei der Abmessung in dem Apparat befindlich gewesenen Flüssigkeitsanteile in das Kölbchen entleert. Man macht sich dadurch unabhängig von den Messungsfehlern, welche durch wechselnde Dicke der am Glas adhärierenden Schichte bei verschiedener Viskosität der Objekte bedingt werden.

Auch bei den beiden Arten der Stickstoffbestimmung empfiehlt es sich für den Anfänger, sich zuerst mit einer reinen Substanz so lange zu beschäftigen, bis eine große Serie von hintereinander ausgeführten Bestimmungen gute Resultate gegeben hat. Ich empfehle dazu wieder reines Leuzin, bei dem man mit Leichtigkeit, selbst bei Verwendung von nur 4 oder 5 *mg*, mit der Theorie (10·69% N) bis auf wenige Hundertstelprozente übereinstimmende Werte erhalten wird. Und im Ernstfalle greife man immer wieder darauf zurück, um damit die Apparate, Reagenzien und die eigene Übung zu prüfen.

Anmerkung. Obwohl ich über keinen hierauf bezüglichen Versuch verfüge, möchte ich hier der Meinung Raum geben, daß auf Grund der im früheren erwiesenen genauen Bestimmbarkeit kleiner Ammoniakmengen durch Destillation und Titration die Möglichkeit gegeben ist, den Phosphor in kleinen Mengen organischer Substanzen zu bestimmen. Der Weg wäre folgender:

Nach Verbrennung einiger Milligramm gewogener Substanz auf „nassem Wege" fällt man die stark salpetersäurehaltige Flüssigkeit mit Ammoniummolybdat, wäscht den Niederschlag an der Handzentrifuge, spült ihn in ein Zersetzungskölbchen und bestimmt darin das Ammoniak im Sinne der vorstehenden Vorschrift.

Einige Beleganalysen.

a) älteren Datums und mit der älteren Form der Absorptionsapparate ausgeführt.

Naphtalin	11·69 *mg* :	6·66 H_2O,	40·10 CO_2 =	6·38% H,	93·55% C	gef.
	8·11 „ :	4·73 „	27·83 „ =	6·53% „	93·59% „	„
				6·29% „	93·71% „	ber.
Cholesterin	12·14 „ :	13·22 „	37·32 „ =	12·18% „	83·88% „	gef.
	11·94 „ :	13·06 „	36·61 „ =	12·24% „	83·63% „	„

Cholesterin . . . . . 10·87 *mg* : 11·87 H_2O, 33·32 CO_2 = 12·22% H, 83·60% C gef.
13·30 „ : 14·53 „ 40·98 „ = 12·23 „ „ 84·04% „ „
12·00% „ 83·86% „ ber.

Leuzin . . . . . . 10·26 „ : 9·06 „ 21·64 „ = 10·11% „ 54·86% „ gef.
5·09 „ (745: 14°) : 0·468 *cm*³ N = 10·72% N gef. 10·69% N ber.
6·72 „ (725: 15°) : 0·639 „ „ = 10·75% „ „ 10·69% „ „
8·79 „ (725: 15°) : 0·832 „ „ = 10·67% „ „ 10·69% „ „
10·91 „ : 5·87 *cm*³ $\frac{n}{70}$ HCl = 0·174 *mg* N = 10·76% gef.
6·44 „ : 3·47 „ $\frac{n}{70}$ HCl = 0·694 „ „ = 10·77 „ „

p-nitro-Benzylchlorid 6·20 „ (715: 18°) : 0·450 *cm*³ N = 8·01% gef., 8·17% ber.

Pyranthren . . . . 10·20 „ : 4·37 H_2O, 35·59 CO_2 = 4·79% H, 95·16% C gef.
4·80% „ 95·20% „ ber.

Perylen . . . . . . 11·90 „ : 5·44 „ 41·62 „ = 5·12% „ 95·38% „ gef.
4·80% „ 95·20% „ ber.

Indanthren . . . . 10·35 „ : 2·87 „ 28·86 „ = 3·10% „ 76·05% „ gef.
3·19% „ 76·00% „ ber.
1·99 „ (700: 17°) : 0·120 *cm*³ N = 6·54% N gef., 6·34% N ber.

Dibenzoyl-1-5. diamino-anthrachinon 12·38 „ 41·57 H_2O, 34·19 CO_2 = 4·13% H, 75·32% C gef.
4·06% „ 75·31% „ ber.
2·86 „ (705: 17°) : 0·170 *cm*³ N = 6·49% N gef., 6·28% C ber.

Anthrazin . . . . . 13·40 „ 5·13 H_2O, 43·29 CO_2 = 4·28% H, 88·11% C gef.
4·24% „ 88·39% „ ber.
9·71 „ (715: 17°) : 0·621 *cm*³ N = 7·08% gef., 7·37 ber.

Flavanthren . . . . 10·84 : 4·10 *mg* H_2O, 35·06 CO_2 = 4·23% H, 88·21 gef.
4·24% „ 88·39 ber.
4·24 *mg* (715: 18°) : 0·288 *cm*³ N = 7·50% N gef., 7·37% ber.

Pr-1n-methyl-2-methyl-3-isopropylindol . 10·97 „ : 9·10 H_2O, 33·60 CO_2 = 9·29% H, 83·53% C gef.
9·15% „ 83·36% „ ber.
5·70 *cm*³ N (710: 18°) : 0·387 „ = 7·44% N gef., 7·49% N ber.
7·00 *cm*³ N (713: 17°) : 0·468 „ = 7·39% „ „ 7·49% „ „

α-Bromisocapronyl-phenylalanin . . . 9·38 „ : 4·91 H_2O, 18·12 CO_2 = 5·86% H, 52·68% C gef.
5·89% „ 52·62% „ ber.
12·53 : 2·65 *cm*³ $\frac{n}{70}$ HCl = 0·53 *mg* N = 4·23% N gef., 4·10% ber.
7·06 : 1·48 „ $\frac{n}{70}$ HCl = 0·296 „ „ 4·19% „ „ 4·10% „

α-Brombutyryl-phenylalanin . . . 9·18 *cm*³ : 4·55 H_2O, 16·70 CO_2 = 5·55% H, 49·61% C gef.
5·16% „ 49·67% „ ber.
7·27 : 1·60 *cm*³ $\frac{n}{70}$ HCl = 0·320 *mg* N = 4·40% N gef., 4·46% ber.

b) mit der neuen Form der Absorptionsapparate ausgeführt von Dr. *S. Edlbacher.*

Choleïnsäure . . . . . 8·02 *mg* : 7·38 H_2O, 21·58 CO_2 = 10·30% H, 73·39% C gef.
10·28% „ 73·41% „ ber.

Naphtalin . . . . . . 10·50 „ : 6·20 „ 36·04 „ = 6·60% „ 93·61% „ gef.
11·21 „ : 6·35 „ 38·46 „ = 6·33% „ 93·56% „ „
6·30% „ 93·70% „ ber.

Cholesterin . . . . 8·69 „ : 9·59 „ 26·74 „ = 12·35% „ 83·92% „ gef.
12·00% „ 83·86% „ ber.

Dibenzoyl-1-5-diamino-anthrachinon . . .	8·97 *mg*: 3·14 H_2O, 24·80 CO_2 =	3·92% H, 75·40% C gef.
		4·06% „ 75·31% „ ber.
Pyranthren	8·11 „ : 3·41 „ 28·25 „ —	4·71% „ 95·00% „ gef.
		4·80% „ 95·20% „ ber.
Perylen	9·12 „ : 4·17 „ 31·87 „ =	5·12% „ 95·31% „ gef.
		4·80% „ 95·20% „ ber.
Indolinon	8·85 „ : 5·41 „ 24·19 „ =	6·84% „ 74·55% „ gef.
		6·88% „ 74·49% „ ber.
	4·06 „ (714; 17°): 0·315 cm^3 =	8·58% N gef.; 8·70% N ber.
Anthrazin	7·77 „ : 3·05 H_2O, 25·26 CO_2 =	4·39% H, 88·62% C gef.
		4·24% „ 88·39% „ ber.
	5·34 „ (712; 15°): 0·351 cm^3 =	7·30% N gef.; 7·37% N ber.
Trional	5·20 „ : 10·05 $BaSO_4$ =	26·55% S gef.; 26·48% ber.
	3·44 „ : 6·66 „ =	26·60% „ „ 26·48% „
Indanthren	2·91 „ (718; 17°): 0·162 cm^3 =	6·19% N gef.; 6·34% N ber.

Sämtliche, für die C-, H- und die beiden N-Bestimmungen erforderlichen Apparate sind von der Firma Gustav Eger, Graz. Zinzendorfgasse, genau nach meinen Angaben in der geschilderten Ausführung zu beziehen.

4. Die Bestimmung des Schwefels und der Halogene in kleinen Substanzmengen.[1])

Von **Fritz Pregl** und **Max de Crinis.**

Für die Abwägung der Substanz hat sich als das Zweckmäßigste erwiesen, diese in 3 *cm* langen und 1—1½ *mm* weiten, beiderseits offenen Kapillaren vorzunehmen. Zu diesem Ende wird die Kapillare, indem man sie mit dem schon erwähnten Aluminiumdrahtbänkchen auf die Wage bringt, gewogen; die auf einem Uhrglas mit einem kleinen Glaspistill, wenn nötig, zerriebene Substanz wird, indem man die Kapillare senkrecht in sie drückt, in einer Länge von 2—4 *mm* hineingepreßt. Dies macht ungefähr 4—8 *mg* Substanz aus. Die Kapillare wird nun abgeklopft und abgewischt, insbesondere dort, wo der freie Querschnitt der Substanz an dem einen Ende zutage tritt. Bei Körpern, welche sich nicht in der beschriebenen Weise auf den kleinen Raum gut zusammenpressen lassen, hilft man sich durch Nachschieben mit einem in das Lumen der Kapillare streng hineinpassenden Glasfaden. Die so beschickte Kapillare bringt man wieder mit dem Aluminiumdrahtbänkchen auf die linke Wageschale, und zwar so, daß das mit Substanz beschickte Ende während der Wägung über den Schalenrand (siehe Fig. 277) hinausragt und etwa davon abfallende Teile auch nicht mitgewogen werden können. Nun nimmt man die Kapillare, so wie beim Auflegen mit der Platinspitzenpinzette *(P)* von ihrer Unterlage ab und läßt sie ziemlich senkrecht in die vorher schon vorbereitete Bombenröhre hineinfallen. Diese bläst man sich aus Thüringer Weichglas von 1 *cm*

---

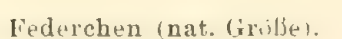
[1]) Die ersten, welche Halogen- und Schwefelbestimmungen in kleinen Mengen organischer Substanzen zur Ausführung brachten, waren *Emich* und *Donau*, Monatshefte f. Chemie. 30. 745. Die Hilfsmittel, deren sie sich dabei bedienten, sowie auch das Verfahren unterscheiden sich vielfach von dem unserigen.

äußerem Durchmesser, 1 *mm* Wandstärke und 15—20 *cm* Länge, nachdem man dieses Rohr zuvor mit Salzsäure und Wasser, mit Seife und Watte gereinigt und durch Abspülen mit Wasser, Alkohol und Erhitzen getrocknet hat. Derartig vorbereitete Röhren bereitet man sich im Bedarfsfalle durch Abziehen und Abschmelzen von Röhrenstücken in der erforderlichen Länge her, wobei auf das Zustandekommen einer Kuppe von gleichmäßiger Wandstärke und Rundung das größte Gewicht zu legen ist. In diese Bomben hat man vor dem Hineinfallenlassen der Kapillare mit der gewogenen Substanz bei Halogenbestimmungen ein hanfkorngroßes Stück Silbernitrat, bei Schwefelbestimmungen ein ebenso großes Stück Baryumchlorid[1]) einzubringen. Nun fügt man etwa $^1/_2$—1 *cm*³ konzentrierte Salpetersäure zu, indem man sie unter Schiefhaltung der Bombe und Drehen derselben die Wände herunterlaufen läßt, so daß eventuell höher haften gebliebene Substanzteile mit heruntergeschwemmt werden können. Nun wird die Bombe sofort in kunstgerechter Weise unter Bildung einer gleichmäßig gestalteten dickwandigen langen Kapillare vor der Gebläseflamme, an ihrem offenen Ende geschlossen und in der russenden Flamme diese Stelle gekühlt. Je nach Bedarf wird nun die Bombe in einem kleinen Schießofen auf 200° oder auf eine höhere Temperatur zwei Stunden lang oder noch länger erhitzt. Wegen des engen Querschnittes sind diese Bomben außerordentlich widerstandsfähig und vertragen anstandslos eine Erhitzung bis zu 300°, ohne daß Gefahr des Springens vorhanden ist, es sei denn, daß der Boden der Bombe oder die Kapillare nicht kunstgerecht ausgeführt worden sind, oder daß man auf die Kühlung in der russenden Flamme vergessen hat. Nach erfolgter Erhitzung und Auskühlung des Schießofens kann man die Bombe getrost herausnehmen und öffnet sie, indem man mit dem Glasmesser die Kuppe der Kapillare abschneidet und abbricht. Das Öffnen der Kapillare in der Flamme ist insofern wenig empfehlenswert, als sich bei der Erhitzung oft durch das Auskristallisieren von Baryumchlorid oder Silbernitrat die Kapillare verstopft, und man dann erst noch zum Abschneiden derselben schreiten muß. Nun wird die Bombe äußerlich gereinigt; in $^2/_3$ ihrer Länge schneidet man sie mit dem Glasmesser an, entfernt aus diesem Schnitt durch Abwischen alle Glassplitter und berührt die Stelle bei schräg gehaltener Bombe mit einem glühenden Glastropfen. Man verhindert dadurch das Hineinfallen von Splittern. Das abgesprengte verjüngte Ende der Bombe setzt man verkehrt auf den übrigen Teil der Bombe, den man zweckmäßigerweise in ein Eprouvettengestell stellt, und füllt ihn mit siedendem, destilliertem Wasser aus einer kleinen Spritzflasche, deren Spitze einen haarfeinen Strahl liefert und die mittelst eines Kautschukschlauches leicht beweglich an das Steigrohr angefügt ist. Nun bringt man an den Rand des Tisches eine reine, mit Schnabel und ebenem Boden versehene Abdampfschale (*Sch*) aus Glas mit einem

[1]) Die Notwendigkeit dieser Maßnahme hat sich schon nach den ersten Versuchen im verflossenen Winter herausgestellt, weil sonst die Werte für den Schwefel stets zu niedrig ausfielen.

Inhalt von 50—70 *cm*³, entfernt den oberen Teil der Bombe und entleert ihren unteren Teil in diese Schale, indem man den heißen feinen Wasserstrahl schräg nach aufwärts in das Innere derselben richtet. Dabei fällt insbesondere, wenn man die Röhre dreht und durch etwas Aufklopfen auf den Tisch nachhilft, sowohl die Kapillare in die Schale, als auch der entstandene Niederschlag von Halogensilber, eventuell Baryumsulfat. Das Nachwaschen des Bombeninnern in der geschilderten Weise wiederholt man noch mehrmals und falls gewisse Anteile des Niederschlages in seltenen Fällen nicht durch den Wasserstrahl allein zu entfernen wären, bedient man sich eines kleinen Federchens (Fig. 296). Dieses schneidet man sich aus einer feinen Hühnerfeder zurecht und kittet das 1—1½ *cm* lange Endstück derselben in eine dickwandige Kapillare mit Harzkitt ein, wie die nebenstehende Zeichnung es darstellt. Nun ergreift man mit der sorgfältig zuvor gewaschenen und ausgeglühten Platinspitzenpinzette die am Boden der Glasschale liegende Kapillare in der Mitte, hält sie vertikal über der Schale und spült sie auf das sorgfältigste sowohl außen als innen ab; auch hier wird man in manchen Fällen genötigt sein, mit der kleinen Federfahne 1—2mal durch die Kapillare durchzufahren.

Fig. 296.



Federchen (nat. Größe).

Eine kleine Bemerkung soll hier über das ausgeschiedene Baryumsulfat Platz finden. Entgegen der sonstigen Erfahrung ist das in der Hitze des Schießofens gebildete Baryumsulfat grob kristallisiert und die glitzernden Kristalle bilden in der Regel ein Aggregat, welches die Oberfläche des ursprünglichen Chlorbaryumkristalles nachahmt. Bei Schwefelbestimmungen ist es nun erforderlich, die das Baryumsulfat enthaltende Flüssigkeit nach Zusatz einiger Tropfen Salzsäure völlig zur Trockne abzudampfen [1]) und nach neuerlicher Befeuchtung mit verdünnter Salzsäure dies zu wiederholen, um auch die letzten Spuren von Salpetersäure zu entfernen. Die Flüssigkeit mit dem darin suspendierten Halogensilberniederschlag kann hingegen ohneweiters der Filtration unterzogen werden.

Zu diesem Zwecke bedienten wir uns eines Mikro-Goochtiegels (siehe Fig. 297) *(g)*, den uns die Firma Heraeus in Hanau aus Platin [2]) angefertigt hat. Er hat eine Höhe von 14, einen oberen Durchmesser von 12 *mm*, besitzt einen durchlochten Boden ohne ein zweites Sieb und außerdem eine Kappe *(k)* samt

[1]) Eine wesentliche Zeitersparnis lassen wir beim Abdampfen dadurch eintreten, daß wir auf das Flüssigkeitsniveau einen durch Watte filtrierten Luftstrom richten.

[2]) Dieselbe Firma stellte mir gegenwärtig einen Mikro-Tiegel mit Filtrierschicht aus Platinschwamm nach dem Prinzipe des „Neubauertiegels" in den Dimensionen des oben beschriebenen Mikro-Goochtiegels her, der den Vorteil hat, daß er stets gebrauchsfertig ist, und bei großer Filtrationsgeschwindigkeit die feinsten Niederschläge zurückhält.

Deckel *(d)*. Sein Fassungsraum macht ungefähr $1^1/_4$ *cm*³ aus und sein Gewicht beträgt rund 3·5 *g*. Für die Beschickung des Tiegels richtet man sich ein für allemal das im Handel als Goochtiegel-Asbest käufliche Präparat zum Zwecke seiner feineren Verteilung in der Weise her, daß man eine Portion desselben in einer Platinschale mit konzentrierter Schwefelsäure, der einige Kubikzentimeter Salpetersäure beigefügt sind, zu einem dünnen Brei anrührt und über der Flamme bis zum Sieden der Schwefelsäure erhitzt. In diesem Moment faßt man die Schale mit einer Tiegelzange, die mit Platinspitzen ausgestattet ist, und taucht alles zusammen in ein bereitstehendes Becherglas, das mindestens $1^1/_2$ Liter destillierten Wassers enthält. Durch die leichte Explosion findet eine noch feinere Auffaserung des Asbestes statt und man trennt nun durch Abgießen der aufgerührten Flüssigkeit das Feinverteilte vom etwa noch Grobgebliebenen. Nach einiger Zeit senkt sich in der Flüssigkeit die Hauptmenge der Fasern allmählich zu Boden, während feinste Teilchen noch in Schwebe bleiben. Diese entfernt man durch wiederholtes Dekantieren. Die Hauptmenge der Fasern saugt man nun auf einer Nutsche ab und wäscht sie, bis das ablaufende Wasser keine Schwefelsäurereaktion mehr gibt. Die abgesaugten Asbestfasern lassen sich vom Papierfilter als zusammenhängende verfilzte Masse abtrennen. Sie werden in eine Flasche geschoben und durch Übergießen von destilliertem Wasser in Suspension gebracht.

Fig. 297.



Utensilien zur Halogen- und Quecksilberbestimmung [illegible]. *A* Absaugkolben mit Gummiring *R* und Schlauch [illegible] *Qu*. *Sch* Glasschale. *PtD* Platindeckel als [illegible] *P* [illegible] *f* Federchen. *K* Kupferblock, darauf [illegible] und *d* sein Deckel.

Man gewöhne sich, vor jeder Serie gleichartiger Analysen den Mikro-Goochtiegel *(g)* sowie seine Kappe und Deckel in einer Eprouvette mit verdünnter Salpetersäure auszukochen und innen mit einem an einem Zündholz aufgewickelten Wattebäuschchen gut auszureiben. Nach sorgfältigem Ausspülen wird der Tiegel, indem man ihn mit der reinen Platinspitzenpinzette faßt, bis zum Verschwinden der Natriumflamme im Bunsenbrenner geglüht und hernach zum Zwecke des Abkühlens auf den schon mehrmals erwähnten Kupferblock *(K)* gestellt. Man bringt den Tiegel nun zum Zwecke der Beschickung mit der erforderlichen Asbestschichte auf die Filtriervorrichtung, die nur aus einem Saugkolben *(A)* besteht, dessen Mündung ein Gummistopfen verschließt, in dessen Bohrung ein nach oben bis auf den Durchmesser des Mikro-Tiegels sich erweiterndes Röhrchen *(R)* steckt. Über dieses Ende ist ein passendes ringförmiges Stück gewaschenen Kautschukschlauches *(R)* gestülpt, in welches der Tiegel bis über seine Mitte luftdicht eingesetzt werden kann. Über das Ansatzrohr des Absaugkolbens ist ein 1 *m* langes Schlauchstück, an seinem Ende mit Quetschhahn *(Qu)* versehen, gesteckt. Nun gießt man den Mikro-Goochtiegel mit der aufgeschüttelten Asbestsuspension voll und erzeugt im Innern des Kolbens durch Ansaugen mit dem Munde am langen Schlauchstück ein gelindes Vakuum und schließt den Quetschhahn. Steht eine Pumpe zur Verfügung, so würde sich deren Anwendung beim Erzeugen des Asbestfilters vielleicht empfehlen, weil das Durchreißen kleiner Asbestteilchen dabei nur vom Vorteil wäre. Hingegen möchte ich von dem Gebrauch einer Pumpe beim Absaugen der Niederschläge entschieden widerraten. Das Asbestfilter wird mit etwas verdünnter Salzsäure gewaschen und dann durch mindestens sechsmalige Füllung mit siedendem Wasser gewaschen. Um die Prozedur abzukürzen, kann man schließlich auch das Wasser mit etwas Alkohol verdrängen. Nach dem letzten Ablaufen alles Flüssigen nimmt man mit den reinen Fingern den Tiegel aus dem Kautschukring, wischt seinen Boden und seine Seitenwände mit einem Gazelappen ab, setzt die Kappe auf und bedeckt ihn mit seinem Deckel, welche beide mittlerweile auf dem Kupferblock in einem Exsikkator verwahrt waren.

Die Trocknung des Tiegels haben wir stets in der Weise vorgenommen, daß wir ihn auf einen größeren Platindeckel *(Pt)* von etwa 4 *cm* Durchmesser, der auf einem Dreieck ruhte, gestellt und diesen Deckel mit einer kleinen Flamme bis zur mäßigen Rotglut erhitzten. Nach 5 Minuten bringt man den Tiegel auf den Kupferblock und ohne ihn vorher gewogen zu haben, setzten wir ihn nochmals auf die Absaugvorrichtung, um ihn dort in der schon einmal geschilderten Weise zuerst mit Salzsäure und dann mit siedendem Wasser zu waschen. Er wird nun nochmals getrocknet und auf den Kupferblock gestellt. Es ist zweckmäßig, weil zeitsparend, nach einigen Minuten diesen Tiegel auf einen zweiten Kupferblock zu setzen oder wenigstens seine Stellung auf dem ersten zu ändern. Nach längstens 5 Minuten wird er gewogen, indem man ihn mit Hilfe der Platinspitzenpinzette auf die Wage stellt. Man wiederholt die Bestimmung der 5. De-

zimale nach weiteren 2 oder 3 Minuten und wird in der Regel finden, daß die Gewichtskonstanz schon erreicht war. Man wird sich auch überzeugen können, daß nach wiederholtem Waschen und Trocknen, wenn es fehlerfrei ausgeführt worden ist, immer dasselbe Gewicht bis auf $^{1}/_{100}$ *mg* für den Tiegel samt Zubehör gefunden wird. Den gewogenen Tiegel bringt man nun wieder auf die Absaugvorrichtung und befeuchtet zu diesem Ende den Kautschukring mit einigen Tropfen Wasser, um einen luftdichten Verschluß zu erzeugen. In den Tiegel bringt man vorsichtig vom Rande her einige Tropfen Wasser, um die Filterschichte zu befeuchten und für Luft undurchlässig zu machen. Nun erzeugt man durch Ansaugen mit dem Munde im Innern des Apparate ein Vakuum, so hoch man es erreichen kann, schließt den Quetschhahn und dekantiert unter Verwendung einer beiderseits zugeschmolzenen, etwa 2 *mm* weiten Glaskapillare als Glasstab den flüssigen Anteil des Schaleninhaltes in den Tiegel. Schließlich spritzt man mit einem feinen, heißen Wasserstrahl den Niederschlag in den Tiegel, spritzt die Glaskapillare ab und wäscht unter Zuhilfenahme des früher erwähnten Federchens die Schale sorgfältig etwa sechsmal mit geringen Flüssigkeitsmengen aus, indem man sie jedesmal, das Federchen entlang, in das Tiegelinnere fallen läßt. Zur Überführung des Schaleninhaltes einschließlich des Niederschlages in den Tiegel bedienen wir uns in neuester Zeit mit größtem Vorteil eines in jeder Apotheke käuflichen „Augentropfers", wodurch sich diese Operation überraschend bequem gestaltet. Man hüte sich, die Innenwand des Tiegels oder das Flüssigkeitsniveau in demselben jemals mit der Glaskapillare, dem Federchen oder mit dem „Augentropfer" zu berühren, weil das Emporkriechen der feinsten Anteile des Niederschlages unbedingt zu Verlusten führen würde. Auch jetzt kann man die letzten Anteile des anhaftenden Wassers vorsichtig durch einige Tropfen Alkohol verdrängen und nach Abnehmen des Tiegels, Aufsetzen seiner Kappe und seines Deckels, an die Trocknung schreiten. Diese wird bei Halogenbestimmungen ebenfalls auf dem Platindeckel als Unterlage vorgenommen, jedoch hoch oben über einer kleinen Flamme bei einer Temperatur von ungefähr 120—130° durch 5 Minuten. Soll Baryumsulfat getrocknet werden, so darf der Tiegel nach unseren wiederholten Beobachtungen niemals mit der freien Flamme in Berührung kommen, denn die dünnen Tiegelwände gestatten reduzierenden Gasen den Durchtritt, sie führen das Baryumsulfat allmählich in Baryumsulfid über und eine Gewichtskonstanz ist dabei nie zu erreichen. Erst nach Verwendung des stärkeren Platintiegeldeckels als Unterlage beim Glühen des Mikro-Tiegels ist es uns gelungen, diese stets zu erzielen. Der so getrocknete Tiegel kommt wie früher nach Entfernung der Flamme zuerst auf einige Minuten auf den ersten und dann auf weitere 5 Minuten auf den zweiten Kupferblock in den Exsikkator und endlich auf die Wage. Es wird sich empfehlen, das Waschen und Trocknen beziehungsweise das Glühen nochmals zu wiederholen; und man wird sich, im exakt durchgeführten Versuch, davon überzeugen können, daß diese fast ohne Einfluß bleiben, d. h. daß sie kaum die Abnahme von $^{1}/_{100}$ bis $^{2}/_{100}$ *mg* bedingen.

Einige Beleganalysen.

Substanz	Einwage		Auswage					
Chloralhydrat	8·82 *mg*	:	22·85 *mg*	AgCl	=	64·09%	Cl	gef.
						64·31%	„	ber.
p-nitro-benzylchlorid	6·05 „	:	5·07 „	„	=	20·73%	„	gef.
						20·67%	„	ber.
Tribromphenol	6·60 „	:	11·25 „	AgBr	=	72·54%	Br	gef.
	6·12 „	:	10·45 „	„	=	72·66%	„	„
						72·48%	„	ber.
α-Brombutyryl-phenylalanin . .	4·91 „	:	2·94 „	„	=	25·48%	„	gef.
						25·45%	„	ber.
α-Bromisocapronyl-phenylalanin .	8·18 „	:	4·48 „	„	=	23·31%	„	gef.
						23·36%	„	ber.
Sulfonal	10·10 „	:	20·60 „	$BaSO_4$	=	28·02%	S	gef.
						28·10%	„	ber.
Trional	6·56 „	:	12·68 „	„	=	26·55%	„	gef.
						26·48%	„	ber.
Benzoldisulfosaures Kalium .	7·30 „	:	10·02 „	„	=	18·86%	„	gef.
						18·79%	„	ber.

Kapillaranalyse.

Von **J. Traube**, Charlottenburg.

I. Die Methode von Goppelsroeder.

Der Name Kapillaranalyse ist zuerst von *Goppelsroeder* gebraucht worden.

Goppelsroeder hat in einer Reihe umfassender Arbeiten[1]) die Bedeutung einer höchst einfachen von *Schönbein* angeregten Methode dargetan, welche für die verschiedensten Zwecke der qualitativen Analyse verwertet werden kann.

Die Methode ist am einfachsten in der Weise ausführbar, daß man an einer horizontalen Aufhängevorrichtung, etwa einem Glasstabe mit Klammervorrichtungen, eine Reihe von Papierstreifen aus schwedischem Filtrierpapier (1 *cm* breit) aufhängt und dieselben 3—4 *cm* tief in die zu analysierenden Lösungen eintaucht. Die ganze Vorrichtung muß durch eine Glasglocke, Zylindervorrichtung oder dergleichen nach außen hin abgeschlossen sein.

Die Analyse der Lösungen etc. wird alsdann dadurch ermöglicht, daß im allgemeinen für das Lösungsmittel und jeden der gelösten Stoffe verschiedene Aufstieghöhen charakteristisch sind, so daß beispielsweise in einer gemischten wässerigen Farbstofflösung die verschiedenen gelösten Farbstoffe in verschiedenen Zonen des Papierstreifens getrennt sichtbar werden und alsdann spektroskopisch oder chemisch identifiziert werden können, während das reine Wasser am höchsten steigt.

Maßgebend für die Höhe, bis zu welcher die verschiedenen Stoffe emporsteigen, sind einerseits deren kapillare Eigenschaften, andrerseits ihre Adsorptionsfähigkeit auf der betreffenden Faser. Es hat sich die allgemeine Gesetzmäßigkeit ergeben, daß je größer die Adsorptionsfähigkeit der betreffenden Stoffe (Farbstoffe etc.) ist, um so geringer ist die Aufstieghöhe und umgekehrt.

[1]) Vgl. namentlich die zusammenfassende Darstellung über Kapillaranalyse, erschienen bei Steinkopff, Dresden 1910, daselbst Literaturangabe S. 5, oder Kolloidzeitschrift, Bd. 4, 5 und 6. *Goppelsroeders* Arbeiten, auch *Pelet-Jolivet*, Die Theorie des Färbeprozesses. Steinkopff, Dresden 1910. S. 120. Daselbst weitere Literatur

Außer von der Natur des betreffenden Stoffes und der Faser (Papier, Leinen, Wolle, Seidenzeug etc.) hängt die Aufstieghöhe noch von verschiedenen Umständen ab:

a) Die Eintauchzone des Papierstreifens in die Flüssigkeit darf nicht zu gering sein, wenn Konstanz der Aufstieghöhe erzielt werden soll. Sie muß mindestens 2 *cm* betragen.

b) Die Aufstieghöhe wächst mit der Zeitdauer des Eintauchens. Nach *Wo. Ostwald*[1]) gilt die Gleichung $S = K t^m$, wo S die Aufstieghöhe und t die Zeit darstellt, während K und m Konstanten sind.

c) Die Aufstieghöhe wächst im allgemeinen mit Zunahme der Konzentration der Lösung.

d) Mit Erhöhung der Temperatur findet meist eine Erniedrigung der Aufstieghöhe statt.

Es ist auch nicht gleichgültig, ob der Papierstreifen vorher feucht oder trocken war, und ob der äußere Luftzug durch Anwendung einer Deckglocke ferngehalten wird oder nicht. Aus alledem folgt, daß man, um vergleichbare Ergebnisse zu erlangen, stets unter denselben äußeren Umständen arbeitet.

Über die Ergebnisse, welche nach dieser zwar rohen, aber biologisch in verschiedener Hinsicht wichtigen Methode gewonnen sind, bei Untersuchungen von Farbstofflösungen, Harnen, Milch, Butter, Pflanzensäften etc., vgl. *Goppelsroeder*, *Pelet-Jolivet*, l. c. und die übrige, daselbst angegebene Literatur.

II. Kapillaranalytische Methoden von J. Traube.

Während *Goppelsroeders* wesentlich qualitative Methode auf Erscheinungen der Kapillarität und Adsorption beruht, fußen die kapillaranalytischen Arbeiten des Verfassers dieses Kapitels lediglich auf Messungen der Oberflächenspannung.

Im Prinzip sind daher alle diejenigen Methoden zur Messung der Oberflächenspannung verwendbar, welche in den physikalischen Lehrbüchern abgehandelt werden. Es hat sich indessen gezeigt, daß die vom Verfasser ausgebildete und in die biologische Praxis eingeführte Tropfmethode für biologische Zwecke allen anderen Methoden weitaus überlegen ist, und sollen daher die für diesen Zweck hergestellten Apparate: das Stalagmometer und das Viskostagonometer, in erster Linie beschrieben werden und im Anschluß daran das Kapillarimeter, lediglich nur deshalb, weil dieses die alte klassische Apparatur der Oberflächenspannungsmessungen darstellt und eine Kontrolle der Genauigkeit stalagmometrischer Messungen ermöglicht.

Das Stalagmometer.

Wenn man an einer sehr sauber gehaltenen kreisförmigen Fläche von 6—8 *mm* Durchmesser bei langsamem Ausflusse Tropfen sich bilden

[1]) *Wo. Ostwald*, Koll. Zeitschr. II. Suppl. S. 20. 1908.

läßt, so werden dieselben außerordentlich gleichmäßig, und da der Tropfen einer Flüssigkeit ein Maß ihrer Oberflächenspannung ist, so kann man mit Hilfe eines geeigneten Tropfapparates diese Konstante mit großer Genauigkeit bestimmen (vgl. auch *Kohlrausch*, Prakt. Phys.).

Die Tropfenvolumina zweier Flüssigkeiten verhalten sich direkt wie die Steighöhen im kapillaren Rohre. Wählt man als Normalflüssigkeit das Wasser, so kann man, da dessen Konstanten der Oberflächenspannung genau bekannt sind, leicht aus dem Tropfenvolumen die Oberflächenspannung auch im absoluten Maße bestimmen.

Bei dem als Stalagmometer bezeichneten einfachen Tropfapparate bestimmt man nun nicht das Tropfenvolumen, sondern die reziproke Größe, d. i. die Anzahl der in einem bestimmten Volumen enthaltenen Tropfen, 1. für die betreffende Flüssigkeit, 2. für Wasser. Das Verhältnis dieser Tropfenzahlen steht demgemäß im umgekehrten Verhältnis zu den relativen Steighöhen im kapillaren Rohre.

Fig. 298.

Der Apparat besteht im wesentlichen aus einer durch zwei Marken *a* und *b* abgegrenzten Kugel, einer Kapillarröhre *c*, welche das Abtropfen verlangsamt, sowie einer sorgfältig abgeschliffenen Abtropffläche *d*. Oberhalb und unterhalb der beiden Hauptmarken *a* und *b* befindet sich noch eine kleine Skala, welche Bruchteile eines Tropfens abzulesen gestattet.

Bei Benutzung des Apparates sorgt man vor allem für völlige Reinheit der Abtropffläche. Dieselbe wird nie mit dem Finger berührt und von Zeit zu Zeit mit einem heißen Gemisch von Kaliumbichromat und konzentrierter Schwefelsäure oder auch bei Untersuchung eiweißhaltiger Flüssigkeiten mittelst Kalilauge und nachher Säure gereinigt.

Die Flüssigkeit wird alsdann am besten mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe oder auch mit Hilfe eines Gummiballs angesogen, und man zählt nun nach Feststellung der Temperatur die Zahl der Tropfen für die betreffende Flüssigkeit, nachdem zunächst der Apparat bei derselben Temperatur für Wasser geeicht worden ist.

Man achtet darauf, daß sich allerhöchstens 20 Tropfen in der Minute loslösen; ist der Abfluß schneller, so kann man allenfalls durch Auflegen des Fingers eine Verlangsamung des Abtropfens herbeiführen. Richtiger ist es aber in diesem Falle, ein anderes Stalagmometer zu verwenden, und werden aus diesem Grunde verschieden schnell tropfende Stalagmometer in einem Satze zu 3 Stück von der Firma *C. Gerhardt* in Bonn geliefert. Die grade Form III läßt ein schnelleres Abtropfen zu wie die beiden anderen Formen I und II und dient zur Untersuchung zäher Flüssigkeiten. Die Formen I und II unterscheiden sich nur durch die verschiedene Größe des kugelförmigen Volumens.

Erschütterungen im Zimmer, welche ein zu schnelles Loslösen des Tropfens hervorrufen können, sind zu vermeiden, ebenso achte man stets darauf, daß die Abtropffläche völlig vom Tropfen benetzt wird, und daß

keine Luftblase in demselben enthalten ist. Werden diese leicht zu befolgenden Vorsichtsmaßregeln beachtet, so kann, wenn man mit Hilfe der kleinen Skala noch Zehnteltropfen abschätzt, bei zwei wiederholten Versuchen mit derselben Flüssigkeit leicht eine Genauigkeit bis auf 0·05 Tropfen erzielt werden. Da ein Tropfen nur ausnahmsweise in dem Augenblick abtropfen wird, wo die Flüssigkeit bei der oberen Marke *a* angelangt ist, so liest man die Anzahl Teilstriche ab oberhalb und unterhalb von Marke *a* und ebenso am Schlusse des Versuches oberhalb und unterhalb von *b*, welche dem ersten beziehungsweise letzten Tropfen entsprechen. Angenommen 20 Teilstriche entsprächen 1 Tropfen, davon hätten sich 8 oberhalb und 12 unterhalb von Marke *a* befunden, so würde der gefundenen Tropfenzahl $^{12}/_{20} = 0{\cdot}6$ Tropfen hinzuzuaddieren sein.

Die Temperatur hat keinen großen Einfluß auf die Tropfenzahl. Eine Steigerung der Zimmertemperatur um 5° vermehrt die Tropfenzahl von 100 Wassertropfen nur um etwa 1, 2 Tropfen. Danach ist die Temperaturkorrektion leicht zu berechnen. Für eine bestimmte Temperatur (meist für 20°) ist die Tropfenzahl für Wasser bestimmt worden und auf dem Apparate eingraviert.

Ist Z die Tropfenzahl für die zu untersuchende Flüssigkeit und Zw die Tropfenzahl für Wasser, so ist der Quotient $100 . Z : Z^w$, die Tropfenzahl für die Flüssigkeit bezogen auf ein Normalstalagmometer, welches 100 Normalwassertropfen bei 15° ergibt. Diese Größe, d. h. die Anzahl Normaltropfen, ist es, welche für biologische und medizinische Zwecke zu berechnen ist. Will man, was aber nicht erforderlich ist, die eigentliche Konstante der Oberflächenspannung γ berechnen (vgl. *J. Traubes* Grundriß der physikalischen Chemie bei *Encke*, Stuttgart 1904, S. 146), so ist zu setzen bei 15° $\gamma = 7158{\cdot}4\,s . \frac{Zw}{Z}$ Ergs., wenn s das spezifische Gewicht der betreffenden Flüssigkeit bei 15° bedeutet. Für biologische und medizinische Zwecke genügt indessen fast immer die Angabe der relativen Tropfenzahlen von Wasser und der betreffenden Flüssigkeit.

Tropfenzählapparat.

Da, wenn man zahlreiche Bestimmungen vorzunehmen hat, das Tropfenzählen eine etwas langweilige Beschäftigung ist, und man sich auch hin und wieder beim Zählen irren kann, so wurde von der Firma *C. Gerhardt* ein automatischer Zählapparat hergestellt, welcher zuverlässig arbeitet.

Man läßt den Tropfen auf die Mitte einer Zelluloidplatte fallen. Hierdurch wird mit Hilfe eines Quecksilberkontaktes ein durch zwei hintereinander geschaltete Trockenelemente gespeister Stromkreis geschlossen und mit Hilfe eines Elektromagneten der Zahn eines Zeigerwerkes derart in Bewegung gesetzt, daß bei jedem auffallenden Tropfen der Zeiger um einen Zahn weiterrückt. Mit Hilfe eines Stiftes, welcher in entsprechende Öffnungen der Zeigerskala eingesetzt werden kann, sorgt man dafür, daß

durch den vorrückenden Zeiger im gewünschten Augenblicke ein Stromschluß herbeigeführt wird, welcher ein Klingelwerk in Tätigkeit setzt, damit der Beobachter vor Schluß des Versuches am Apparate erscheint.

Ein Unterbrecher an der Außenseite des Verschlußkastens des Apparates ermöglicht es, den Strom im gegebenen Moment, nachdem man die Bruchteile des ersten Tropfens abgelesen hat, einzuschalten und vor dem letzten Tropfen wieder auszuschalten.

Fig. 299.



Der Apparat führt zu guten Ergebnissen, wenn man Sorge trägt, daß der auffallende Tropfen aus der richtigen Höhe möglichst auf die Mitte der Zelluloidplatte herabfällt, und wenn man ferner die Quecksilbermenge, welche den Kontakt herbeiführt, so abmißt, oder den Kontaktstift so einschraubt, daß jeder fallender Tropfen nur einmal und nicht etwa zweimal den Kontakt herbeiführt. Bei geringer Übung wird man in bezug auf die Einstellung leicht die nötige Sicherheit erlangen.

Das Viskostagonometer.

Das Viskostagonometer (*C. Gerhardt* in Bonn) dient zur Bestimmung der Konstante der Oberflächenspannung und derjenigen der inneren Reibung.

Fig. 300.

In bezug auf die Konstante der Oberflächenspannung ist dieser Apparat dem Stalagmometer namentlich dann vorzuziehen, wenn nur sehr kleine Flüssigkeitsmengen zur Verfügung stehen; denn man kann mit Hilfe des Viskostagonometers die Oberflächenspannung und auch die innere Reibung noch sehr genau bestimmen, wenn man auch nur zwei bis drei Tropfen etwa eines Serums zur Verfügung hat. Die Genauigkeit der Bestimmung ist ebenso groß wie diejenige mit Hilfe des Stalagmometers und eine Bestimmung jeder der beiden Konstanten dauert nur 3—4 Minuten.

Das Viskostagonometer besteht im wesentlichen aus einer geteilten Skalenröhre *a*, welche unten in eine engere Kapillarröhre *b* ausläuft, die wiederum in der Abtropffläche *c* endigt.

Mit Hilfe der Pumpe wird der Apparat gefüllt und man bestimmt hier direkt die Zahl der Skalenstriche, welche einem oder mehreren Tropfen, 1. der Flüssigkeit, 2. des Wassers entsprechen. Dieses Verhältnis ist direkt proportional dem Verhältnis der kapillaren Steighöhen. Damit man beim Herabfallen des ersten Tropfens gleichzeitig den fallenden Tropfen beobachten und den entsprechenden

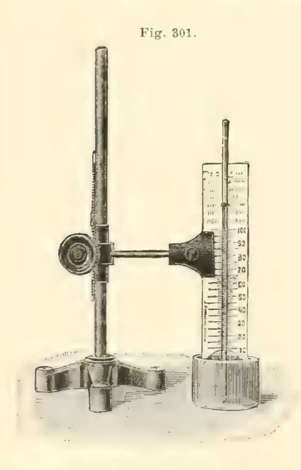
Teilstrich am oberen Teile der Skalenröhre ablesen kann, wird ein Stativ beigegeben mit zwei rechtwinklig zueinander stehenden Spiegeln, welche das Bild des fallenden Tropfens im oberen Spiegel widerspiegeln. Man sieht hierbei scharf auf die Skala und erkennt, indem man ein wenig nach dem Spiegel hinschielt, leicht die Reflexe des fallenden Tropfens.

Soll die Reibungskonstante festgestellt werden, so bestimmt man für die betreffende Flüssigkeit sowie für Wasser bei der gleichen Temperatur die Ausflußzeit vom Teilstrich 0—400 oder 500. Das Verhältnis der Ausflußzeiten ist dann gleich der spezifischen Zähigkeit. Da die Reibung von der Temperatur mehr beeinflußt wird als die Oberflächenspannung, so empfiehlt es sich, für sehr genaue Messungen die Skalenröhre mit einem Mantel nach Art des *Liebig*schen Kühlers nebst Thermometer zu versehen. Indessen im allgemeinen wird man von der Beschaffung dieses Mantels absehen können.

Das Kapillarimeter.

Das Kapillarimeter *(C. Gerhardt)* besteht aus einem kapillaren Rohre und einer Skala aus Milchglas, sowie einem Stativ, welches mit einer Feinstellschraube versehen ist, die die genaue Einstellung der unteren Spitzen der Skala auf die Flüssigkeitsoberfläche gestattet. Diese Spitzen entsprechen dem Nullpunkt der in halbe Millimeter geteilten Skala. Bei den Versuchen wird so verfahren, daß man zunächst die Röhre stets absolut rein erhält. Das geschieht in der Weise, daß die Röhre von Zeit zu Zeit mit konzentrierter Salpetersäure gereinigt wird, sowie nach jeder Beobachtung durch Aufsaugen von Wasser und Alkohol (nicht Äther). Man verfährt hierbei so, daß man nach Füllung mit der Flüssigkeit beim Trocknen der Röhre dieselbe mit der Pumpe verbindet und gleichzeitig das andere Röhrenende mit einer mit Schwefelsäure gefüllten Flasche. Damit hierbei kein Staub in die Röhre gelangt, lüftet man nach erfolgtem Trocknen zunächst stets das an der Pumpe befindliche Röhrenende. Es wird auch dafür gesorgt, daß bei der Füllung mit Alkohol oder Salpetersäure die Flüssigkeit nicht etwa in den mit der Röhre verbundenen schwarzen Kautschukschlauch eintritt und durch gelöste oder zersetzte Kautschuksubstanz die Röhre verunreinigt wird. Sorgt man in dieser Weise für die Reinhaltung der Röhre, so kann dieselbe jahrelang benutzt werden. Die gereinigte und getrocknete Röhre wird nun nebst ihrer Skala möglichst vertikal in das Stativ eingespannt und nun die Stativschraube so gedreht, daß die unteren Spitzen

Fig. 301.



möglichst gleichzeitig die Flüssigkeitsoberfläche berühren. Alsdann saugt man zwei- bis dreimal die Flüssigkeit unter Vermeidung von Speicheleinfluß etwas über den definitiven Stand des Flüssigkeitsmeniskus empor und beobachtet nun mit Hilfe einer Lupe die Stellung des Flüssigkeitsmeniskus; doch darf man beim Ablesen nicht länger als eine halbe bis eine Minute warten, da sonst eine Inkonstanz der Steighöhe infolge mangelnder Benetzung der Röhrenwand eintreten könnte. Man wiederholt die Beobachtung, indem man stets vorher die Röhre in der oben geschilderten Weise trocknet, und darf der Unterschied zweier Ablesungen nicht mehr als höchstens 0·2 *mm* betragen. Für viele Zwecke wird es genügen, wenn man die Steighöhe der betreffenden Flüssigkeit auf Wasser bezieht, und sind die Apparate bei einer bestimmten Temperatur für Wasser geeicht. Will man die Kapillaritätskonstanten in absolutem Maße berechnen, so sei auf die verschiedenen Lehrbücher, welche sich mit physikalisch-chemischen Methoden beschäftigen, beispielsweise physikalisch-chemische Methoden von *J. Traube*, *Leopold Voss*, Hamburg hingewiesen.

Es sei indessen nochmals ausdrücklich bemerkt, daß das Kapillarimeter für eiweißhaltige Flüssigkeiten und sonstige Kolloidlösungen, durch welche die Röhre leicht verunreinigt wird, ebenfalls für sehr zähe Flüssigkeiten nicht zu empfehlen ist. Für die meisten biologischen Zwecke sind daher die Tropfmethoden ganz wesentlich vorzuziehen, dahingegen wird in vielen anderen Fällen das Kapillarimeter, dessen Handhabung bei Beobachtung der kleinen Vorsichtsmaßregeln auch sehr einfach ist, vortreffliche Dienste leisten können. Die Bestimmung der Oberflächenspannung mit diesem Apparat läßt sich in wenigen Minuten herbeiführen.

Konzentrationsbestimmungen sowie Bestimmungen der Löslichkeit, Teilungs- und Adsorptionskoeffizienten auf kapillaranalytischem Wege.

Während Salze, starke Mineralsäuren und Basen, sowie mehrere Hydroxyl- und Amidogruppen enthaltende organische Stoffe die Oberflächenspannung des Wassers nur wenig beeinflussen (kapillarinaktive Stoffe, Stoffe mit großem Haftdrucke), bewirken Stoffe, wie Äther, Ester, Aldehyde, Ketone, Fettsäuren, die gewöhnlichen Alkohole etc. (kapillaraktive Stoffe, Stoffe mit geringem Haftdrucke) bei ihrer Lösung in Wasser eine sehr erhebliche Verminderung der Oberflächenspannung.[1])

Dieser Umstand ermöglicht es, mit Hilfe des Stalagmometers oder Kapillarimeters oft sehr genaue Konzentrationsbestimmungen von selbst geringen Mengen solcher kapillaraktiver Stoffe nicht nur in reinen wässerigen Lösungen, sondern auch bei Gegenwart größerer Mengen kapillarinaktiver Stoffe auszuführen[2]), eine Feststellung, die auch für

[1]) *J. Traube*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 17. 2294. 1884 und *Liebigs* Ann. 265. 27.

[2]) *J. Traube*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 19. 892. 1886; 20. 2644. 2825. 2829 u. 2831. 1887.

biologische und medizinische Zwecke (siehe w. u. Harn, Mageninhalt etc.) von Bedeutung ist.

In einem Stalagmometer, welches 100 Wassertropfen gibt, wird beispielsweise durch Zusatz von 1% Natriumchlorid die Tropfenzahl nur um einen kleinen Bruchteil eines Tropfens vergrößert, während der Zusatz von 1% Amylalkohol die Zahl der Tropfen von 100 auf etwa 182 anwachsen läßt.

Unter diesen Umständen kann man auch für kapillaraktive Stoffe feststellen, ob und eventuell welche Mengen in Wasser löslich sind.[1])

Besonders sei hingewiesen auf die vortreffliche Anwendbarkeit der Methode zur Bestimmung von Teilungs- und Adsorptionskoeffizienten.[2])

Bei der Bestimmung der Verteilung eines organischen Stoffes zwischen einer wässerigen und einer festen Phase oder einem organischen Lösungsmittel hat man sich bisher fast immer darauf beschränkt, gelöste Säuren oder Basen zu untersuchen, da diese Stoffe sich leicht titrieren lassen, während die Konzentrationsbestimmungen bei anderen gelösten, namentlich verdampfbaren Stoffen oft Schwierigkeiten machen. Nach der kapillaranalytischen Methode ist es aber sehr leicht, für einen gelösten kapillaraktiven Stoff (Ester, Äther, Alkohol etc.) die Konzentration der wässerigen Phase vor und nach dem Schütteln mit der zweiten Phase aus der Tropfenzahl oder Steighöhe zu bestimmen, wenn man für eine Anzahl wässeriger Lösungen von bestimmtem Gehalte die Oberflächenspannungen vorher festgestellt hat. Ist die zweite Phase in Wasser ein wenig löslich (wie Benzol etc.), so ist eine entsprechende kleine Korrektion anzubringen.

Kapillaranalytische Diagnose von Krankheiten.

Auf Grund theoretischer Erörterungen[3]) gelangte der Verfasser dieses Kapitels zu der Auffassung, daß bei manchen Erkrankungen des Magens und der Nieren Oberflächenspannungsdifferenzen der verschiedenen Magensäfte und Urine eintreten dürften, auch machte er zuerst auf die verschiedene Kapillaraktivität von Toxinen und Antitoxinen aufmerksam.

Hiermit im Einklange zeigten sodann *Traube* und *Blumenthal*[4]), daß die Tropfenzahl des gesunden Mageninhalts sowie auch diejenige bei leichteren Verdauungsstörungen um einen Mittelwert von 118—126 Normaltropfen herum schwankt. Bei schweren Erkrankungen, wie Karzinom, Pylorusstenose etc., wurden dagegen fast immer wesentlich größere Tropfen-

[1]) *Motylewski*, Zeitschr. anal. Chem. 38. 417. 1904.

[2]) *Traube*, *Pflügers* Arch. ges. Phys. 105. 552. 1904 u. Verh. d. deutsch. physik. Ges. 10. 900. 1908.

[3]) *Pflügers* Arch. ges. Phys. 105. 541 u. 559. 1904; 123. 419. 1908; 132. 551. 1910 u. 140. 109. 1911.

[4]) *Traube* und *Blumenthal*, Arch. f. exp. Path. u. Therap. 2. 117. 1905, ferner *Kunoff*, In.-Diss. Berlin 1905. — *Bickel*, Deutsche med. Wochenschr. 1905. Nr. 28 und Frl. *Kascher*, In.-Diss. Berlin 1905.

zahlen der frisch zu untersuchenden Mageninhalte — 126 bei 150 Normaltropfen festgestellt. Eine größere Tropfenzahl führt daher — bei Abwesenheit von Galle — zu dem Verdacht, daß eine schwere Erkrankung vorliegt.

Zahlreiche Urinuntersuchungen[1]) führten zu den Ergebnissen, daß normale Urine und alle diejenigen pathologischen Urine, die von gut arbeitenden Nieren abgesondert werden, Tropfenzahlen ergeben, die etwa zwischen den Grenzen 102 bis 115 Normaltropfen sich bewegen. Sobald aber die Nieren schlecht arbeiten (Nephritis mit Peptongehalt, Lebercirrhose, Ovarialkrebs, schwere Pneumonie, Karzinom der Gallenblase etc.), wurden Normaltropfen von 115—140 Tropfen beobachtet. Die Arbeitsfähigkeit der Nieren und die Oberflächenspannung der Urine gehen der Theorie gemäß (siehe l. c.) einander parallel. Die täglich festzustellenden Tropfenzahlen der Urine eines Kranken ergeben häufig ein getreues Bild des Krankheitsverlaufes.

Auch für die direkte Untersuchung des Blutes scheinen die kapillaranalytischen Methoden von Wert zu sein; denn, während normale, menschliche Sera etwa 109—112 Normaltropfen ergaben, wurden für urämische Sera 116—118 Normaltropfen gefunden.[2])

Methoden von *M. Ascoli* und *Izar*.

Von besonderer Bedeutung in diagnostischer Beziehung dürfte die vielbeachtete kapillaranalytische Methode zur Diagnose von Krebs, sowie auch Lues, Tuberkulose, Typhus etc. sein, welche wir *M. Ascoli* und *Izar*[3]) verdanken.

Die italienischen Autoren[3]) fanden, daß in geeigneter Weise hergestellte Extrakte aus Rattensarkomen und menschlichen Tumoren mit passend verdünnten Blutseris Karzinomatöser vermischt nach Erhitzen im Brutschranke eine nach der Tropfmethode leicht meßbare Verminderung der Oberflächenspannung (Erhöhung der Tropfenzahl) ergaben, wie sie in dem Maße bei Verwendung des Blutserums Gesunder oder an anderen Krankheiten Erkrankter nicht eintrat. In ähnlicher Weise reagierten geeignete Typhusbazillenextrakte auf Typhusserum, luetische Milzextrakte auf Luesserum und ebenso trat bei Tuberkulose sowie der Echinokokkenerkrankung eine derartige spezifische Reaktion ein („Meiostagminreaktion").

---

[1]) *Traube, Blumenthal* und *Kunoff*, l. c., ferner *Billard* und *Dieulafé*, C. r. Soc. Biol. 1904—1907.

[2]) Vgl. *Bickel, Kascher, Kunoff*, l. c.

[3]) *M. Ascoli*, Münchener med. Wochenschr. 1910. Nr. 2. — *Ascoli* und *Izar*, ibid. 1910. Nr. 4, 8, 18, 22 u. 41. — *Izar*, Biochem. Zeitschr. Bd. 29 und Berliner klinische Wochenschr. 1911. Nr. 39. — *Micheli* und *Cattoretti*, Wiener klin. Wochenschr. 1910. Nr. 44. — *Tedesco*, ibid. 1910. Nr. 26. — *Verson*, ibid. 1910. Nr. 30. — *de Agostini*, Med. Klin. 1910. Nr. 29. — *d'Este*, Berliner klin. Wochenschr. 1910. Nr. 19. — *Stabilini*, ibid. 1910. Nr. 32. — *Stammler*, Münchener med. Wochenschr. 1911. Nr. 30 und *Kelling*, Wiener klin. Wochenschr. 1911. Nr. 3.

Größte Sorgfalt ist zu verwenden auf die Herstellung der Extrakte — der sogenannten Antigene, und es sei hier in bezug auf manche kleine Einzelheiten auf die angegebene Literatur hingewiesen.

Bei bösartigen Geschwülsten wurde zunächst so verfahren, daß der verriebene Tumorbrei 24 Stunden bei 37° mittelst 95%igen Alkohols wiederholt extrahiert wurde. Der Tumorrückstand wurde alsdann bei 50° auf dem Wasserbade getrocknet, alsdann nach dem Verreiben mehrere Male 24 Stunden lang mit warmem Äther ausgezogen, und nach nochmaligem Trocknen abermals mit Alkohol so lange extrahiert, bis letzterer farblos war. Die filtrierten alkoholischen und ätherischen Extrakte wurden zum Trocknen verdunstet und diese Trockenextrakte mit wenig Äther aufgenommen. Man erhielt so das Stammantigen, von welchem beim Gebrauche verschiedene Verdünnungen durch vorsichtiges Vermengen mit physiologischen Kochsalzlösungen hergestellt wurden.

In späterer Zeit verfuhren *Ascoli* und *Izar* so[1]), daß sie den zerkleinerten Tumor zunächst bei 37° in dünnster Schicht auf Glasplatten ausbreiteten und mittelst eines warmen Luftstromes rasch trockneten; darauf wurde der getrocknete Tumorbrei im pulverisierten Zustande 24 Stunden lang bei 37° über Chlorkalzium weiter getrocknet und alsdann zermahlen. Die trockene Tumormasse wurde bei 50° in geschlossenen Gefäßen extrahiert, indem je 5 *g* Tumorbrei mit 25 cm^3 Methylalkohol versetzt wurden. Nach genügendem Auskochen wird mittelst eines geeigneten Filtrierpapiers (Schleicher & Schüll Nr. 598) zunächst heiß und nach dem Erkalten nochmals filtriert.

Von den Antigenemulsionen wurden nun Verdünnungen hergestellt von $^1/_{10}$, $^1/_{20}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$ etc. und je 1 cm^3 dieser Verdünnungen mit 9 cm^3 des mittelst physiologischer Kochsalzlösung auf $^1/_{20}$ verdünnten Blutserums versetzt. Es wurde in einem Stalagmometer (Tropfenzahl für Wasser 50—60 Tropfen) die Tropfenzahl bestimmt einmal vor dem Erwärmen im Brutschrank, das andere Mal nach etwa 2stündigem Erwärmen in demselben. Rührte das Serum von einem tumorkranken Menschen her, so wurde bei Anwendung passender Verdünnungen der Antigene nach dem Erwärmen eine Erhöhung der Tropfenzahl von meist 4—8 Tropfen beobachtet, während bei Normalseris etc. die Tropfenzahl sich nur um 1 oder allerhöchstens 2 Tropfen erhöhte. Dringend erforderlich erwies es sich aber, die parallelen Versuchsreihen mit dem Normalserum und dem zu prüfenden Serum bei verschiedensten Antigenverdünnungen (bis zu 1 : 10.000) durchzuführen, da namentlich bei den nach der älteren Methode hergestellten Extrakten die optimalen Abweichungen erst bei größeren Verdünnungen eintraten.[2])

Micheli und *Catoretti* haben übrigens l. c. festgestellt, daß die Reaktion bei karzinomatösen Erkrankungen auch gelingt, wenn man anstatt der Tumorextrakte normale Pankreasextrakte verwendet.

---

[1]) Vergl. u. a. *Izar,* Münchener med. Wochenschr. 1911. Nr. 39.

[2]) Über den Grad der Zuverlässigkeit der Methode vergl. auch *Izar,* l. c.

Über die Herstellung der Antigene bei Syphilis, Typhus etc. siehe die angegebene Literatur, vgl. auch die Zusammenstellung der Arbeiten und ihrer Ergebnisse bei *Th. Hirschfeld*, Deutsche med. Wochenschr. 1911. Nr. 27 bis 29.

Der Umstand, daß viele Autoren bei der Ausführung der kapillaranalytischen Methode von *Ascoli* und *Izar* keine Erfolge erzielt haben, ist zweifellos auf die große Labilität der sogenannten Antigene zurückzuführen. Durch Schütteln werden dieselben bereits zerstört, auch Temperaturdifferenzen, ferner die Art der Verdünnungen können von üblem Einflusse sein, und es ist daher sorgfältig auf verschiedenste kleinste Einzelheiten zu achten, welche — nach den bisherigen Erfahrungen — besser als durch ein Lehrbuch und die angegebene Literatur durch persönliche Unterweisung in der Ausübung der Methoden erfahrener Forscher erlangt werden kann.[1])

Kapillaranalytische Bestimmung der pharmakodynamischen und toxischen Wirksamkeit von Arzneimitteln und Giften.

In theoretischen Arbeiten (siehe *Pflügers* Archiv l. c.) hat der Verfasser dieses Kapitels dargetan, daß das gesamte osmotische Verhalten gelöster Stoffe in erster Linie durch die Oberflächenspannung bestimmt ist. Je mehr ein Stoff die Oberflächenspannung des Wassers vermindert, um so leichter diosmiert derselbe meist durch Membranen. Von der Fähigkeit der Osmose hängt aber in erster Linie seine Wirksamkeit im Körper ab; denn beispielsweise damit ein Stoff gut und schnell narkotisierende Eigenschaften habe, muß er vor allem schnell die Zellen durchwandern können.

Danach wird es verständlich, daß die anästhesierende Kraft verschiedenster Anästhetika meist einfach den Oberflächenspannungen der wässerigen Lösungen parallel geht[2]) und daß beispielsweise in der Kokainreihe[3]) (Ekgonin, Novokain, Eukain, Kokain etc.) die anästhesierende Wirkung der Alkaloide zunimmt, je mehr das betreffende Alkaloid die Oberflächenspannung des Wassers vermindert, je kapillaraktiver das betreffende Alkaloid ist. Man kann nun ferner die Kapillaraktivität gelöster Stoffe vielfach steigern durch Zusatz anderer Stoffe, so beispielsweise zahlreicher Alkaloidsalze (Chinin, Kokain, Atropin etc.) durch Zusatz minimaler Mengen Alkalien[4]) (Natriumkarbonat etc.), und in diesen Fällen zeigt sich, daß

[1]) Vergl. hierüber *Izar*, l. c.

[2]) *Traube*, *Pflügers* Archiv. 105. 555. 1904.

[3]) *E. Pribram*, Wiener klin. Wochenschr. 21. Nr. 30 und *Goldschmidt* und *Pribram*, Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 6. 1. 1909.

[4]) Vgl. eine von *J. Traube* demnächst in der Biochem. Zeitschr. zu veröffentlichende Arbeit; ferner *Pribram*, *Pflügers* Archiv. 137. 350. 1911. — *Gros*, Münchener med. Wochenschr. 1910. 2042 und *Laewen*, ibid. 1910. 2044.

stets die Steigerung der pharmakologischen und toxischen Wirksamkeit parallel geht der Verminderung der Oberflächenspannung beispielsweise der Alkaloidlösung durch den Alkalizusatz, so daß eine einfache stalagmometrische Untersuchung ausreicht, um festzustellen, ob und in welchem Maße die Wirksamkeit eines Alkaloids etc. durch derartige Zusätze gesteigert wird. Die kapillaranalytische Methode ist hier kaum weniger sicher als das Tierexperiment.

Farbstoffmilieus als Aktivatoren für kapillaranalytische Wirkungen von Salzen und Ionen.

Während unter gewöhnlichen Umständen (siehe weiter oben) Salze und starke Elektrolyte kapillarinaktiv sind, man demnach die Konzentration einer einfach wässerigen Salzlösung kapillaranalytisch ebensowenig bestimmen kann wie die Verteilung eines Salzes zwischen 2 Phasen oder seine Adsorption durch eine feste Phase, sind diese Aufgaben für zahlreiche Ionen und Salze gut lösbar, wenn man die Salzlösungen tropfenweise (mit T. K.-Tropfglas) oder mit Hilfe feiner Pipetten in kleinen Mengen gewissen kolloidalen Milieus zusetzt, deren Oberflächenspannung durch den Zusatz erhebliche Änderungen erfährt. Bewährt haben sich nach dieser Richtung besonders 2 Farbstoffmilieus: eine 0·2%ige Lösung des basischen Farbstoffes: Nachtblau und des saueren Farbstoffes: Wollviolett (beide Farbstoffe von der Firma E. Merck zu beziehen). Setzt man zu 10 cm^3 dieser Farbstofflösungen tropfenweise bestimmte Salzlösungen etc. hinzu, so zeigt sich, daß vorwiegend die Anionen die Oberflächenspannung und andere Eigenschaften des basischen Nachtblaus ändern, vorwiegend die Kationen dagegen die Oberflächenspannung des sauren Wollvioletts.[1]) Namentlich giftige Ionen (Blutgifte) wirken auch „vergiftend" auf diese Farbstoffmilieus, so namentlich J, CNS, ClO_4 etc. auf Nachtblau, giftige Schwermetalle, Alkaloide etc. auf Wollviolett. Quecksilberchlorid wirkt indessen (vielleicht anionisch) auch stark vergiftend auf Nachtblau, so daß man noch 1:3,000.000 T. $HgCl_2$ mit Hilfe dieses Farbstoffes vermöge des Stalagmometers nachweisen kann. So verminderte beispielsweise der Zusatz von 1 Tropfen $^1/_4$ aeq. $HgCl_2$ zu 10 cm^3 0·2%igen Nachtblaus die Tropfenzahl von 58·2 auf 45·5. KJ und KCNS geben noch in Verdünnungen von 1:300.000 Teilen der Nachtblaulösungen einen meßbaren Tropfenausschlag, ebenso kann man mit Hilfe des Systems Wollviolett noch 1:3,000.000 T. Kokain, Akonitin, Atropin etc. bestimmen. Die Methode ist also äußerst empfindlich und kann man mittelst derselben Mengen von Quecksilber, Jod, Alkaloiden etc. auch bei Gegenwart

[1]) Vgl. Berliner klin. Wochenschr. 1911. Nr. 10. Deutsche med. Wochenschr. 1911. Nr. 7. Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. 1911. 44. 556 und namentlich die ausführliche demnächstige Abhandlung in den Kolloid-chemischen Beiheften.

zahlreicher anderer Stoffe quantitativ bestimmen, wie solches nach keiner anderen Methode möglich ist. Das Jodion verhält sich hierbei ganz anders wie etwa das nicht als Ion vorhandene Jod und wirkt auf das Nachtblau in so viel höherem Maße als etwa Br und Cl, daß die Gegenwart derartiger Ionen die quantitative Bestimmbarkeit von Jodionen auf diesem Wege nur wenig einschränken.

Man kann auch Jod, Quecksilber etc. auf diesem Wege kapillartitimetrisch bestimmen, denn wenn man beispielsweise eine bestimmte Nachtblaulösung durch eine bestimmte kleine Menge $HgCl_2$ vergiftet, so kann man die durch den Tropfenausschlag meßbare Vergiftung des Farbstoffmilieus wieder rückgängig machen, wenn man mittelst einer feinen Pipette oder des T. K.-Tropfglases soviel KJ zusetzt, daß das $HgCl_2$ sich völlig in mikroskopisch oder ultramikroskopisch fein verteiltes HgJ_2 umgesetzt hat. In derselben Weise kann man durch Alkaloidsalze in bezug auf die Oberflächenspannung veränderte Wollviolettlösungen mit Hilfe verdünnter Tanninlösungen kapillaranalytisch titrieren. Siehe näheres hierüber Ber. d. Deutschen chem. Gesellsch. 44. 559. 1911.

Besonders ist diese Aktivierungsmethode mittelst eines Farbstoffes auch geeignet, um die Adsorptionskoëffizienten der verschiedensten giftigen Stoffe (KJ, $HgCl_2$, Alkaloidsalze) gegen verschiedenste Adsorbentien zu bestimmen; so beispielsweise gegen Kaolin, indem man vor und nach der Verteilung die Konzentration der wässerigen Phase mit Hilfe von Nachtblau oder Wollviolett feststellt.

Kapillaranalytische Untersuchung von Arzneimitteln und Giften mit Hilfe von Farbstoffmilieus.

Wie erwähnt wurde, aktivieren die Anionen (in freiem wie gebundenem Zustande) gewisse basische Farbstoffmilieus wie das Nachtblau, während die Kationen saure Farbstoffmilieus wie das Wollviolett in bezug auf die Oberflächenspannung und andere physikalische Eigenschaften verändern. Da indifferente Stoffe auf jene Milieus gar nicht einwirken, so ergibt sich zunächst, daß man mit Hilfe des Stalagmometers in irgend einem beliebig gefärbten Arzneimittel, einem Gifte, einem Farbstoffgemische etc. auch bei Gegenwart beliebiger indifferenter Stoffe leicht erkennen kann, ob Kationen oder Anionen zugegen sind; vielfach kann man auch an dem Grade der kapillaraktivierenden Wirkung auf die Farbstoffmilieus erkennen, welcher Art die Kationen bzw. Anionen sind, besonders auch wie giftig dieselben sind, denn es hat sich herausgestellt — vgl. die zitierten Arbeiten — daß im großen und ganzen die durch die Änderung der physikalischen Eigenschaften, wie Oberflächenspannung, gemessene Giftigkeit von Stoffen gegenüber den Farbstoffmilieus parallel geht deren Giftigkeit gegenüber anderen kolloidalen Milieus, insbesondere dem Blute und anderen Körpersäften.

Findet man also beispielsweise beim Hinzufügen eines Tropfens eines flüssigen oder gelösten Arzneimittels zu 10 *cm*³ 0·2⁰/₀iger Nachtblau- und Wollviolettlösung, daß die stalagmometrisch gemessene Oberflächenspannung der Nachtblaulösung sich nur sehr wenig, dabei gegen die Wollviolettlösung sehr stark ändert, so wird man meist richtig schließen, wenn man annimmt, daß der die Arzneiwirkung bedingende Bestandteil im wesentlichen ein — giftigeres — Kation ist. Die kapillaranalytische Methode führt hier auch zu einem Wege, Arzneibestandteile zu erkennen, zu sondern und dementsprechend Arzneimittel zu verbessern.[1])

[1]) Siehe namentlich die obengenannte ausführliche Zusammenfassung der Giftarbeiten des Verfassers in den Kolloid-chemischen Beiheften.

Biochemische und chemo-therapeutische Arbeitsmethoden mit Trypanosomen.[1]

Von **M. Nierenstein**, Bristol.

Beim Arbeiten mit pathogenen Protozoen handelt es sich nicht nur um die Wahl eines geeigneten Wirtes für die Parasiten, sondern auch um eine gute Verpflegung der Versuchstiere und um sanitäre Hausung derselben; viele Experimente gehen öfters durch Vernachlässigung der Versuchstiere zugrunde. Dieser Hinweis, wie unbedeutend er auch erscheinen mag, ist beim Arbeiten mit Versuchstieren immer angebracht.

Die gebräuchlichsten Laboratoriumstiere sind Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde und Affen. Als größere Versuchstiere eignen sich auch Esel, Pferde und Kühe. Ziegen, Schweine und Katzen sind für Trypanosomen unbrauchbar, da die Tiere der Infektion gegenüber sich refraktorisch verhalten.

I. Versuchstiere.

Mäuse. Das Arbeiten mit Mäusen ist ein sehr bequemes, die Tiere lassen sich leicht in Glasgefäßen aufbewahren — breithalsige Flaschen, die mit einem Drahtnetz, das mit Blei beschwert ist, verschlossen sind — das Futter, gewöhnlich Reis, dient auch zur Bettung, indem man das Glasgefäß einige Zentimeter hoch füllt. Infektionserreger, wie z. B. Trypanosomen, Spirochäten etc., lassen sich gut in Mäusen erhalten. Ob Mäuse für chemotherapeutische Experimente zu empfehlen sind, muß dahingestellt bleiben. Ihre Toleranz für eine Reihe von Präparaten ist eine zu große, was aus untenstehender Tabelle zu entnehmen ist[2]):

---

[1]) *Laveran* et *Mesnil*, Trypanosomes et Trypanosomiases (Paris 1904); auch in englischer Sprache. — *Döflein*, Die Trypanosomen, ihre Bedeutung für Zoologie, Medizin und Kolonialwirtschaft. Jena (1909).

[2]) *Breinl* and *Nierenstein*, Bio-chemical and therapeutical studies on trypanosomiasis. Ann. trop. med. Anal. parasit. 3. 420 (1909).

	Maximale Dosis pro Kilogramm Körpergewicht:	
	Atoxyl	Arsenophenylglycin
Maus	0·17 *g*	0·6 *g*
Ratte	0·17 *g*	0·4 *g*
Meerschweinchen	0·08 *g*	0·12 *g*
Kaninchen	0·07 *g*	0·22 *g*
Hund	0·01 *g*	0·2 *g*

Außerdem läßt sich der Mäuseorganismus allem Anschein nach sehr leicht von den Parasiten mittelst sonst in anderen Tieren nicht effektiven Drogen befreien. Manche Präparate haben einen eigentümlichen Einfluß auf Mäuse, es macht z. B. azetyliertes Atoxyl normale Mäuse zu „Tanz-

Fig. 302.



Fig. 303.



Fig. 304.



mäusen".[1]) In ihren physiologischen Reaktionen sind Mäuse von den Ratten verschieden, so verhalten sie sich auch manchen pathogenen Protozoen gegenüber verschieden, wie z. B. Trypanosoma lewisi, das von Ratten normal beherbergt wird, dagegen nicht in der Maus leben kann. Da öfters beim Arbeiten mit Trypanosomen in Ratten Mischinfektionen mit T. lewisi vorkommen, so empfiehlt es sich, die Stämme durch Mäuse pathogen zu „filtrieren", indem man das Infektionsmaterial von Zeit zu Zeit den Ratten entnimmt und auf Mäuse überträgt.

Die verschiedenen Präparate werden gewöhnlich durch Injektion dargereicht, was aber bei den kleinen Dosen, die von den Mäusen vertragen werden, seine Schwierigkeiten hat.

[1]) *Ehrlich,* Chemo-therapeutische Trypanosomenstudien. Berliner klin. Wochenschrift. 44. 312 (1907).

Ehrlich[1]) empfiehlt die von ihm eingeführte „Kakesverfütterung", wo das Kakespulver vor dem Verbacken mit einer wässerigen oder alkoholischen Lösung des Präparates imprägniert wird. Da die Mäuse diese Nahrung (z. B. bei der Darreichung von Parafuchsin) verweigern und durch Verhungern zugrunde gehen, so hat *Ehrlich* folgende Bereitungsweise vorgeschlagen: 1 *g* Parafuchsin — um den oben genannten Fall zu wählen — wird in 90 *g* Alkohol und 10 *g* Oleinsäure I Kahlbaum heiß gelöst. Die Oleinsäure führt das Parafuchsin in das unlösliche ölsaure Salz über, wodurch der Geschmack weniger belästigt wird, außerdem wird hierdurch auch die Resorption begünstigt. Mit obiger Lösung werden Albert-Kakes (gepulvert) getränkt — es kommen hierbei 3 cm^3 der Lösung (1 cm^3 = 0·01 *g* Parafuchsin) auf 8 *g* des Pulvers — diese sodann getrocknet, zerrieben und mit Hilfe von Wasser oder Milch nach Zusatz von 0·6 *g* Glidin pro Kakes zu möglich consistentem Teig angerührt, der auf Glasplatten ausgerollt und nach Zerschneiden in kleine Plättchen getrocknet wird. Diese Nahrung wird nach kurzer Angewöhnung von den Mäusen sehr gut aufgenommen. Es empfiehlt sich aber, das Gewicht der Nahrungsaufnahme zu kontrollieren und bei Sinken des Körpergewichtes eine Pause normaler Ernährung eintreten zu lassen.

Fig. 305.



L. H. Marks[2]) wiederum hat eine bequeme Methode beschrieben, die es ermöglicht, mittelst einer kleinen Sonde Mäusen beliebige Heilstoffe mit Leichtigkeit in genauer Dosierung intrastomachal zuzuführen. Umstehende Abbildungen stellen die Sonde und die Manipulation dar. Die Figuren sind der Originalarbeit des Herrn *Marks* entnommen.

Nachdem das Maul mäßig weit geöffnet ist (Fig. 304), wird die mit Wasser angefeuchtete Magensonde in der Mitte gefaßt und seitlich neben der Zunge mit ganz leichtem Druck nach hinten eingeführt; sie gleitet gewöhnlich sofort in die Speiseröhre. Wenn die Sonde genügend tief eingeführt ist, wird die Spritze gefüllt, angesetzt, entleert, mit etwas Kochsalzlösung nachgefüllt, wieder angesetzt und wieder entleert. Man kann leicht 1—2 cm^3 Flüssigkeit einspritzen.

---

[1]) *P. Ehrlich*, Chemo-therapeutische Trypanosomenstudien. Berliner klin. Wochenschrift. 1907. Nr. 9—12. Vgl. auch *C. H. Browning*, Chemo-therapy in Trypanosome infections. Journ. of pathol. and bacteriol. 12. p. 166 (1908).

[2]) *L. H. Marks*, Über intrastomachale Behandlung trypanosomeninfizierter Mäuse. Zeitschr. f. Immunitätsforschung und experimentelle Therapie. 2. S. 350 (1909). Vgl. auch Derselbe, Fütterung von Mäusen mittelst Magensonde. Arbeiten a. d. kgl. Inst. f. exp. Therapie zu Frankfurt a. M. 1908. Heft 4.

Anwendung bei einigen Stoffen nach *Marks*.

	Letale Dosis	Maximale Dosis
Calomel (in Suspension) .	0·005 *g*	0·002 *g*
Salzsäure	0·5 cm^3 6%iger Lösung	0·5 cm^3 5%iger Lösung
Chin. hydrochlor.	0·1 *g*	0·08 *g*
Jodkalium	0·03 *g*	0·01 *g*
Natr. salicyl.	0·035 *g*	0·02 *g*
Antipyrin	0·04 *g*	0·01 *g*
Magnesiumsulfat	0·4 *g*	0·2 *g*
Sublimat	0·0007 *g*	0·0004 *g*
Strychnin	0·0005 *g*	0·0003 *g*
Morphin. hydrochl. . . .	0·02 *g*	0·006 *g*
Arsenigsaures Na . . .	0·0005 *g*	0·00025 *g*

usw.

Als Maximaldosis ist diejenige Menge anzusehen, die bei einer Anzahl von Mäusen (17—25 *g*) noch gegeben werden kann, ohne daß der Tod nach einiger Zeit eintritt.

Für das Trypanorosan, das *Marks* gegen experimentelle Trypanosomiasis verwendet, gibt er folgende Vorschrift an: das Trypanorosan wir mit der 5fachen Menge Methylalkohol gelöst und mit einer 8%igen Rohrzuckerlösung entsprechend verdünnt. Die Lösung erfolgt am besten in der Weise, daß man die Substanz in kochendem Alkohol löst, mit heißer Rohrzuckerlösung zu der gewollten Menge auffüllt, das Gemisch noch einmal kurz aufkocht, dann auf 60—65° abkühlt und so injiziert.

Ratten. Für chemo-therapeutische Zwecke sind Ratten sehr zu empfehlen, sie vertragen verhältnismäßig hohe Dosen und sind ziemlich leicht am Leben zu erhalten. In Käfigen, die 3—6 Ratten fassen, sind sie gut aufbewahrt, doch muß man darauf achten, daß die Tiere miteinander nicht kämpfen und daß das kampfsüchtige Tier **schleunigst** isoliert wird.

Auch Meerschweinchen sind von Bedeutung für chemo-therapeutische Studien. Sie sind ziemlich leicht zu handhaben und haben den großen Vorteil kleineren Versuchstieren gegenüber, daß man an ihnen leicht das Steigen und Fallen der Temperatur während der Infektion und der Behandlung verfolgen kann. Erwähnt sei, daß Meerschweinchen öfters Lungenkrankheiten erliegen, so daß man auf besonders gute und warme Hausung achten muß. Beim Arbeiten mit Trypanosomeninfektionen haben Meerschweinchen auch den Übelstand, daß sie öfters negativ, d. h. ohne Parasiten im Blute sterben. Die Sektion ergibt aber auch dann ein normales Bild der Infektion.

Kaninchen, die im großen und ganzen zu den besten Laboratoriumstieren zu rechnen sind, haben bei manchen Protozoeninfektionen den großen Nachteil, daß die Krankheit ein chronisches Bild nimmt. Besonders erfährt man diesen Übelstand bei Trypanosomeninfektionen, die Tiere siechen lang-

sam dahin, entwickeln zwar die symptomatischen Entzündungen der Augen. Geschwülste an den Ohren und Genitalien, doch findet man einen negativen Ausfall bei der mikroskopischen Untersuchung des Blutes. Dieses hat seinen augenscheinlichen Nachteil bei chemo-therapeutischen Untersuchungen. Außerdem reagieren die, mit Trypanosomen infizierten Kaninchen leicht auf trypanozoiden Substanzen, wie z. B. Atoxyl, Arsenophenylglycin usw., was öfters auf vielversprechende, aber, leider, oft versagende Heilungsversuche schließen läßt.

Von großem therapeutischen Werte sind besonders Heilversuche an **Affen** und heißt es gerade bei diesen Versuchstieren für eine reinliche Hausung, gute Verpflegung und regelmäßige Fütterung sorgen! Affen unterliegen einer Reihe von Krankheiten, besonders dem Lungenleiden, und muß man daher Sorge tragen, daß die Tiere vor Erkältungen geschützt werden. *A. Breinl* hat die Beobachtung gemacht, daß afrikanische Affen, wie z. B. Cercopithecus collitrichus, einige Immunität Trypanosomeninfektionen gegenüber zu zeigen scheinen und muß man daher auf die Wahl der Versuchstiere acht geben. Es eignet sich für diese Zwecke Macacus rhesus am besten.[1]

II. Trypanosomen.

Von den verschiedenen Trypanosomenstämmen eignet sich T. brucei für experimentelle Zwecke am besten. Die Infektionsdauer ist eine kurze, das Krankheitsbild ist mit Ausnahme von Kaninchen ein normales, die Parasiten erscheinen in 1—2 Tagen im peripheren Blute, sie reagieren prompt auf trypanozoide Stoffe und haben den großen Vorteil, daß, falls eine vollständige Sterilisation des Körpers nicht gelungen ist, die Parasiten schon in 16—25 Tagen wieder erscheinen.[2] Die Rekurrenz bei T. gambiense dauert 50—60 Tage.[3] Die Parasiten zeigen oft Virulenzzunahme, entweder bei verschiedenen Passagen[4] oder bei der Behandlung mit Arsenikalien[5]; bei Farbstoffbehandlung scheint dagegen die Virulenz abzunehmen.[6] Die Trypanosomen bekommen bei der Behandlung mit trypanozoiden Agenzien gegen dieselben „fest" und gelingt es, „atoxylfeste", „trypanrotfeste" usw. Stämme zu züchten.[7] Diese Festigkeit

---

[1]) Über unsere Erfahrungen bei Trypanosomen vgl. *A. Breinl* und *M. Nierenstein*, Bio-chemical and therapeutical studies on Trypanosomiasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. **3**. 395—420 (1908).

[2]) *Breinl* und *Nierenstein*, Bio-chemical and therapeutical studies on Trypanosomiasis. Ann. of. Trop. Med. and Parasit. **3**. 417 (1909).

[3]) Dieselben, l. c.

[4]) Dieselben, l. c., auch *W. Yorke*, On the pathogenicity of a Trypanosome (T. rhodesiense) from a case of Sleeping Stickness contracted in Rhodesia. Ibid. **4**. 351 (1910) (Literatur).

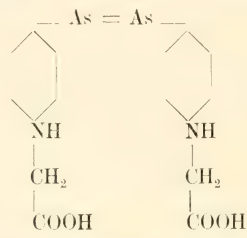
[5]) *Moore*, *Nierenstein* und *Todd*, Notes on the effects of therapeutic agents on Trypanosomes. Ibid. **2**. 221 (1908).

[6]) Dieselben, l. c.

[7]) *Ehrlich*, Chemo-therapeutische Trypanosomenstudien. Berliner klin. Wochenschr. 1907. Nr. 9—12. — *Mesnil* et *Brimont*, Sur les propriétés de races de trypanosomes résistants à l'atoxyl et aux Sérums. Comptes rend. des séances de la Société de Biologie.

soll, wie *Ehrlich*[1]) nach Versuchen von *Werbitzki* und *Gonder* vor kurzem mitgeteilt hat, bei der Passage durch die Rattlaus (Haematopinus spinulosus) bei arsenophenylglycinfesten T. lewisi verschwinden. Die Festigkeit scheint nur für die betreffende Tierspezies, in welcher sie erworben wurde, gut zu halten.[2])

Fast alle Säugetiertrypanosomen reagieren auf trypanozoide Agenzien, die einzige Ausnahme bildet T. lewisi, das nur von Arsenophenylglycin



angegriffen wird.[3]) Kaltblütertrypanosomen[4]) werden durch trypanozoide Agenzien nicht beeinflußt, dagegen scheinen Vögeltrypanosomen[5]) sich in einigen Fällen positiv zu verhalten. Die Parasiten rufen anatomische Veränderungen hervor, doch muß hier auf die Fachliteratur der Fußnote der ersten Seite dieser Abhandlung verwiesen sein. Die Trypanosomeninfektion ist von Autoagglutination der roten Blutzellen[6]) und von einer Zunahme der Azidität des Blutserums begleitet.[7]) Sehr eingehend hat *W. Yorke* die Autoagglutinationserscheinungen bei verschiedenen Trypanosomeninfektionen (auch bei der Schlafkrankheit des Menschen) untersucht und neben Autoagglutininen auch Isoagglutinine und Heteroagglutinine nachweisen können. Es sei hier auf diese Arbeit verwiesen. Trypanosoma brucei ruft einen

---

64. 637 (1908). — *Breinl* und *Nierenstein*, Weitere Beobachtung über die Atoxylfestigkeit der Trypanosomen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 27 (1908). — Dieselben, Bio-chemical and therapeutical studies on trypanosomiasis. Ann. of trop. med. and parasit. **3**. 413 (1908).

[1]) *Ehrlich*, Über Chemotherapie. Zentralbl. f. Bakteriol. Bericht über die 5. Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie usw. in Dresden. Beilage zu Abteilung **1**. L. Referate. S. 94—108 (September 1911).

[2]) *Breinl* und *Nierenstein*, Weitere Beobachtung über die Atoxylfestigkeit der Trypanosomen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 27 (1908). Vgl. dagegen *Roehl*, Über den Wirkungsmechanismus des Atoxyls. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 11 (1909).

[3]) *Schilling*, Chemotherapeutische Versuche bei Trypanosomeninfektionen. Archiv für Schiffs- und Tropenhygiene. **13**. 1 (1909).

[4]) *E. Brumpt*, Rôle pathogène et mode de transmission du Trypanosoma inopinatum Sergent. Comptes Rendus de la Société de Biologie. **61**. 167 (1906).

[5]) *F. G. Novy* and *R. E. Knapp*, On the Trypanosomes of birds. Journ. of Infectious Diseases **2**. 256 (1905).

[6]) *W. Yorke*, Auto-agglutination of red blood cells in Trypanosomiasis. Proc. Roy. Soc. **83**. 238 (1910) und Ann. Trop. Med. and Parasit. **4**. 529 (1910). (Literatur!)

[7]) *Nierenstein*, Observations on the acidity and alkalinity of the blood in Trypanosome infections. Ibid. **2**. 227 (1908).

starken Abbau der Zelleiweiße und des Lecithins bei den Versuchstieren hervor.[1])

Verschiedene Substanzen verursachen das Verschwinden des Blepharoblastes bei Trypanosomen.[2]) Zu diesen Substanzen gehören in erster Linie diejenigen mit orthochinonoider Konstitution wie die Pyronine. Ähnlich verhalten sich die Acridine und auch Oxazine. Abweichend davon verhalten sich das aus m-Toluylendiamin und Formaldehyd gewonnene Acridingelb. Atoxyl, Antimon, Acetatoxyl, Arsenophenylglycin, Trypanrot, Trypanblau u. a. m. liefern negative Resultate. Eine etwas besondere Stellung nehmen die Substanzen aus der Gruppe des Triphenylmethans: Parafuchsin, Tryparosan ein. In großen Dosen ($^1/_{1000}$—$^1/_{750}$ pro 20 *g* Tryparosan, $^1/_{2000}$—$^1/_{1500}$ bei Parafuchsin) injiziert, bewirken sie neben ziemlich intensiven Veränderungen im Protoplasma der Zelle gewöhnlich auch das Verschwinden des Blepharoblasten, jedoch ist der Einfluß der genannten Verbindungen in dieser Beziehung im Vergleiche zum Einfluß der Verbindungen mit chinoider Konstitution relativ schwach.

Überimpfungen von T. brucei auf Kaltblüter (Nattern, Schildkröten) rufen Veränderungen in den Parasiten hervor.[3]) Die Trypanosomen werden kleiner, das Protoplasma körnig. Bei Rückimpfung auf Ratten entwickeln sich sehr große, auffallend gut färbbare Trypanosomen. Dieselben zeigen Virulenzsteigerung, die sich auf 20 Passagen erhalten sollen. Überimpfung auf Schildkröten verursacht Zystenbildung und auch Kleinwerden der Trypanosomen. Atoxylbehandlung ruft auch Zystenbildung hervor.[4])

III. Arbeiten in vivo.

Beim Arbeiten mit Trypanosomen in vivo empfiehlt es sich, das infizierte Blut mit Natriumcitrat zu verdünnen. Für Ratten (Gewicht 140—175 *g*) verwendet man 0·4 cm^3 der Lösung, hierauf dürfen nicht mehr als 6—8 Trypanosomen pro Gesichtsfeld (Zeiss 4, D. D.) bei T. brucei (bei anderen Gattungen verwendet man stärkeres Infektionsmaterial) kommen. Man erhält so bei einem normalen T. brucei-Stamm folgende Resultate: die Parasiten erscheinen im Blute nach 24 Stunden, am nächsten Tage findet man 12—15 Parasiten pro Gesichtsfeld (Zeiss 4, D. D.), am nächsten Tage 25—40 Parasiten, am dritten Tage 100—150 Parasiten, am vierten Tage stirbt die Ratte. Die Injektion der trypanozoiden Substanz erfolgt am besten spät am zweiten oder früh am dritten Tage.

[1]) *T. Fellmer*, Stoffwechseluntersuchungen bei mit Nagana-Trypanosomen infizierten Kaninchen. Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. exp. Therap. 3. 474 (1909).

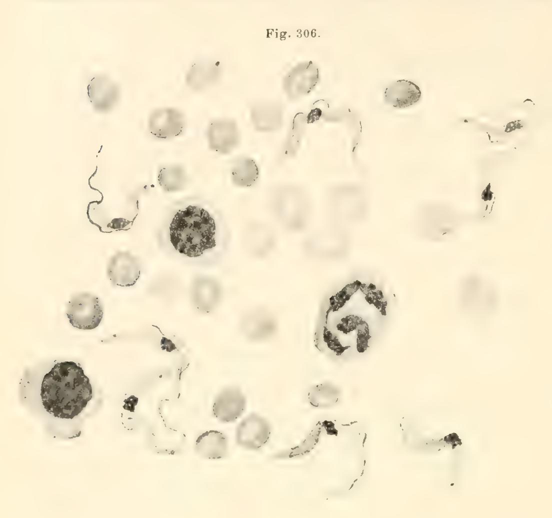
[2]) *F. W. Werbitzki*, Über blepharoblastlose Trypanosomen. Zentralbl. f. Bakter. u. Parasitenk. 1. Abt. 53. 303 (1909).

[3]) *Wendelstadt* und *Fellmer*, Einwirkung von Kaltblüterpassagen auf Nagana- und Lewisitrypanosomen. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 5. 337 (1910).

[4]) *J. E. S. Moore* and *A. Breinl*, The Cytology of the Trypanosomes. Ann. of trop. med. and parasit. 1. 441 (1907).

Die Parasiten werden am besten unter dem Deckgläschen untersucht, sie sind leicht durch ihre schnelle Bewegungen aufzufinden. T. brucei, nansi und auch lewisi sind sehr lebhaft in ihren Bewegungen, T. gambiense dagegen viel langsamer.

Fig. 306.



Nach der Injektion von trypanozoiden Substanzen nimmt die Beweglichkeit der Parasiten ab. Sie zeigen Autoagglutination und erstarren langsam.

Zum Ausforschen [1]) von Trypanosomen eignet sich Romanovsky (Methylblau und Eosin). Man verwendet hierfür „Schmieren", indem man den Bluttropfen mit einer Nadel ausstreicht, oder den feuchten Bluttropfen. Das Blut entnimmt man dem Schwanz (Ratten, Mäuse) oder dem Ohr (Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde usw.).

[1]) Vgl. hierzu *Billet*, Modification à la méthode de coloration *Romanowsky-Giemsa*, Compt. rend Soc. Biol. **61**. 753 (1906). — *C. Franço*, Coloration vitale des Trypanosomes. Bull. de la Société Portugaise des Sciences Naturelles. **1**. 9 (1907). — *Giemsa*, Färbemethoden für Malariaparasiten. Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. **32**. 307 (1902). — Derselbe, Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode usw. Ibid. **37**. 308 (1904). — *M. Gottenberg*, Methode zur Darstellung von Spirochäten und Trypanosomen in Organschnitten. Arch. f. Hygiene. **64**. 243 (1908). — *L. Halberstaedter*, Untersuchungen bei experimentellen Trypanosomenerkrankungen. Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. **38**. 525 (1905). — *Laveran*, Sur une méthode de coloration des noyaux applicable en particulier à l'étude des hématozoaires endoglobulaires. Compt. rend. Soc. Biol. **52**. 549 (1900). — *W. B. Leishman*, A method producing chromatin staining in sections. Journal of Hygieny. **4**. 434 (1904). — *Levaditi*, Méthode sur la coloration des spirilles et des trypanosomes dans le sang. Compt. rend. Soc. Biol. **55**. 1505 (1903). Vgl. hierzu *J. J. van Logham*, Some notes on the Morphology of Spirochaeta duttoni in the organs of rats. Ann. trop. med. et parasit. 1. 342 (1907). — *Loeffler*, Neue Verfahren zur Schnellfärbung von Mikroorganismen, insbesondere Blutparasiten usw. Deutsche med. Wochenschr. **33**. 169 (1907). — *F. Marino*, Coloration des Protozoaires et observations sur la neutrophili de leur noyau. Annales de l'Institut Pasteur. **19**. 761 (1905). — Derselbe, Au sujet de la coloration des protozoaires. Ibid. **19**. 351 (1905). — *S. E. Moore* and *Breinl*, The Cytology of the trypanosomes. Ann. trop. med. et parasitology. **1**. 441 (1907). — Dieselben, The life

Neben den organischen Arsen- und Antimonverbindungen[1] haben die Benzedinfarbstoffe[2] eine ausgesprochene trypanozoide Wirkung. In den Farbstoffen scheint die Aminogruppe als **Trypanophobe-Gruppe**[3] zu fungieren.

Von den verschiedenen trypanozoiden Substanzen seien hier die folgenden erwähnt. Wir geben hier auch die wirksame Dosis für eine ausgewachsene zahme Ratte (140—175 *g*) an. Des weiteren sei auf die Literatur verwiesen.

Atoxyl[4]) (p-aminophenylarsensaures Natrium): $NH_2 . C_6H_4 . AsO\begin{matrix}-ONa\\ \\OH\end{matrix} + n\,H_2O$. 0·5 *cm*³ einer 5%igen Lösung. Die Parasiten verschwinden in 6—19 Stunden.

Acetyliertes Atoxyl (acetyl-p-aminophenylarsinsaures Natrium): $CH_3 . CO . NH . C_6H_4 . AsO\begin{matrix}ONa\\OH\end{matrix} . H_2O$. 0·8 *cm*³ einer 5%igen Lösung.[7])

Arsenophenylglycin: $HOOC . CH_2 . NH . C_6H_4 . As = As . C_6H_4 . CH_2 . COOH$. 1 *cm*³ einer 5%igen Lösung. Die Parasiten verschwinden in 1 bis 3 Stunden.

Natriumantimonyltartrat: 0·5 *cm*³ einer 1%igen Lösung. Die Parasiten verschwinden in 1—5 Stunden.

Trypanrot:

$N = N$. $N = N$

NH_2 H_2N

NaO_3S $NaSO_3$ O_3SNa SO_3Na

1 *cm*³ einer 5%igen Lösung. Die Parasiten verschwinden in 24 Stunden für kurze Zeit.

---

history of Trypanosoma equipedrum. Proc. Royal Soc. Vol. **80**. 288 (1908). — *J. W. W. Stephens* and *S. R. Christophers*, The practicle study of Malaria and other Blood Parasites. 3rd Edition (Liverpool 1908). — *Zettnow*, Eine Methode der Doppelfärbung bei Flagellaten, Pilzen, Spirillen und Bakterien sowie bei einigen Amöben. Zentralbl. f. Bakteriol. Orig. **24**. 945 (1898).

[1]) *Breinl* and *Nierenstein*, The action of arylstibonic acids in experimental trypanosomiasis. Annal. tryp. med. and parasit. **3**. 365 (1909).

[2]) *Mesnil* et *Nicolle*, Traitement des trypanosomiases avec les couleurs de Benzidine. Annales de l'Institut *Pasteur*. **20**. 513—588 (1907).

[3]) *Moore*, *Nierenstein*, and *Todd*, Concerning the treatment of experimental trypanosomiases. Ann. trop. med. and paras. **2**. 271 (1908).

[4]) Bezüglich Kristallwasser des Atoxyls vgl. Biochem. Handlexikon. **1**. 226 (1911).

IV. Arbeiten in vitro.

Beim Arbeiten in vitro verfährt man am besten nach der von *Neven*[1]) beschriebenen Technik der Reagenzglasversuche von *Ehrlich*. Für diese Versuche eignet sich nicht das Blut stark infizierter und dem Tode naher Tiere. Die Parasiten solcher Versuchstiere werden den Erfahrungen von *Neven*[2]), *Mesnil*[3]) und auch *Friedberger*[4]) gemäß schon leicht durch Kochsalzlösung abgetötet. Es ist daher zweckmäßiger, Blut zu verwenden, das noch nicht zu große Mengen von Trypanosomen enthält. Zur Blutentnahme wird die Maus durch Halsschnitt mit einer sterilen Schere getötet und das Blut in physiologischer Kochsalzlösung aufgefangen. Diese Trypanosomenaufschwemmung wird im Reagensglas mit dem ebenfalls in Kochsalzlösung gelösten Arzneistoff zu gleichen Teilen gemischt und von Zeit zu Zeit eine Probe unter dem Mikroskop beobachtet. Die in den Tabellen angegebene Verdünnung ist immer die Endverdünnung, welche sich nach der Mischung der Arzneilösung mit der Trypanosomenaufschwemmung ergibt. Als Kontrolle dienen Trypanosomen in physiologischer Kochsalzlösung, und der Unterschied in der Bewegung der Parasiten in der Kontrolle gegenüber derjenigen in der Mischung mit dem Chemikale dient als Maßstab für die Wirkung derselben. Folgende zwei Tabellen aus der Dissertation des Herrn Dr. *Neven* mögen als Illustration der Technik dienen.

Tabelle 1.

Natronsalz der Paraoxyphenylarsinsäure mit T. brucei.

Verdünnungen:

Zeit	1:10	1:20	1:40	1:50
sofort	schwach bewegl.	schwach bewegl.	mäßig gut bewegl.	gut beweglich
3 Minuten	„ „	„ „	„ „ „	„ „
5 „	alle unbeweglich	„ „	„ „ „	„ „
8 „	. . . .	„ „	„ „ „	„ „
10 „	. . . .	sehr schwach bewegl.	„ „ „	„ „
15 „	. . . .	alle unbeweglich	„ „ „	„ „
20 „	. . . .	. . . .	„ „ „	„ „
25 „	. . . .	. . . .	„ „ „	„ „
30 „	. . . .	. . . .	„ „ „	„ „
40 „	. . . .	. . . .	schwächer bewegl.	„ „
50 „	. . . .	. . . .	„ „	„ „
60 „	. . . .	. . . .	„ „	„ „

[1]) *Otto Neven*, Über die Wirkungsweise der Arzneimittel bei Trypanosomiasis. Diss. Bern 1907. S. 13.

[2]) Derselbe, l. c.

[3]) *Mesnil* et *Brimont*, Sur les propriétés de races des trypanosomes résistant à l'atoxyl et aux Sérums. Comptes Rendus de la Société de Biol. **64**. 637 (1908).

[4]) *Friedberger*, Über die Behandlung der experimentellen Nagana mit Mischungen von Atoxyl und Thioglykolsäure. Berliner klin. Wochenschr. **45**. 1714—1717 (1908).

Tabelle 2.

Paraoxyphenylarsenoxyd mit T. brucei.

Verdünnungen:

Zeit	1 : 100.000	1 : 1,000.000	1 : 2,000.000	1 : 4 000 000	1 : 10 000 000
sofort	alle unbewegl.	gut beweglich	gut beweglich	gut beweglich	gut beweglich
3 Minuten	. . . . . .	schwach bew.	schwach bew.	„ „	„ „
5 „	. . . . . .	alle unbewegl.	„ „	schwach bwgl	„ „
8 „	. . . . . .	. . . . . .	alle unbewegl.	„ „	schwach bwgl
10 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	einige unbwgl.	„ „
12 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	alle unbewegl	„ „
15 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	„ „
20 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	schwach bwgl.
25 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	einige unbwgl.
30 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	„ „
35 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	viele unbwgl
40 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	„ „
45 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	d. meist unbw
50 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	„ „
55 „	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	. . . . . .	alle unbewegl.

Diese Versuche in vitro haben bekanntlich zu den epochemachenden Arbeiten *Ehrlichs* geführt, die ergeben haben, daß im Organismus das Atoxyl (p-aminophenylarsinsaures Natrium)

ONa
AsoO
OH

NH₂ → NH_2

reduziert wird, wobei das stark trypanozoide p-Aminophenylarsenoxyd [1])

AsO



NH_2

entsteht, das erst auf die Parasiten abtötend wirkt. Atoxyl hat in vitro

[1]) *Ehrlich*, Chemotherapeutische Trypanosomenstudien. Berliner klin. Wochenschr. **44**. 233—236. 280—283. 310—314 und 341—344 (1907). — Derselbe, Über die Behandlung der Trypanosomenkrankheiten. Therapie der Gegenwart 47, 218 (1907). — Derselbe, Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. Ber. d. Deutschen chem. Gesellschaft. **42**. 17—47 (1909). — Derselbe, Über moderne Chemotherapie. Verhandl. d. Deutschen dermatologischen Gesellsch. X. Kongreß S. 52—70 (1908). — Derselbe, Über die Partialfunktion der Zelle. Münchener med. Wochenschr. 56. 217—222 (1909). — *Ehrlich* und *Hata*, Die experimentelle Chemotherapie der Spirillosen. S. 114—161. Springer, Berlin 1010.

keinen Einfluß auf die Trypanosomen. Von diesem Gedanken dann ausgehend, hat *Ehrlich* das Arsenophenylglycin[1])

— As = As —

HOOC . H_2C . NH NH . CH_2 . COOH

und das Dioxydiamidoarsenobenzol[2])

As = As

H_2N NH_2

OH OH

der Medizin geschenkt.

Die Reduktion der p-Aminophenylarsinsäure haben *Levaditi* und *Yamanouchi*[3]) durch Leberemulsion ausgeführt, es entsteht hierbei die von ihnen „Tryponotoxyl" genannte trypanozoide Substanz. Das „Trypanotoxyl" ist thermolabil (*Levaditi* und Mitarbeiter). Nach *Röhl*[4]) handelt es sich hierbei um die Bildung von p-Aminophenyloxyd, nach *Breinl* und *Nierenstein*[5]) wiederum um freies Arsen, das infolge der Oxydation des Atoxyls entsteht. *Levaditi* und *Yamanouchi* vermischten für ihre Versuche eine 4-, 2- respektive 0·2%ige Atoxyllösung mit Leberemulsion in physiologischer Kochsalzlösung und fanden, daß diese Mischung nach einem zweistündigen Aufenthalt bei 38° C sich außerordentlich toxisch für Trypanosomen erwies, indem dieselben die Parasiten sofort bewegungslos machte und nach einiger Zeit vollkommen zerstörte. Eine ähnliche Eigenschaft besaßen nach ihren Versuchen ebenfalls Lunge und Muskel, während sich Leukozyten, Niere, Knochenmark, Milz und Rückenmark in dieser Hinsicht negativ verhalten.

---

[1]) *Ehrlich*, l. c.

[2]) *Ehrlich* und *Hata*, l. c.

[3]) *Levaditi* et *Yamanouchi*, Mécanisme d'action de l'Atoxyl dans les Trypanosomiases. Comptes Rendus de la Société de Biologie. **65**. 23 (1908). — *Levaditi, Brimond* et *Yamanouchi*, Action du Trypanotoxyl sur les races résistant à l'Atoxyl. Ibid. **65**. 25 (1908). — *Levaditi*, Mécanisme d'action des composés arsenicaux dans les Trypanosomiases. Ibid. **66**. 33 (1909). — Derselbe, Mécanisme d'action des composés arsenicaux dans les Trypanosomiases. Bull. de la Société de Pathologie Exotique. **2**. 45 (1909). — Vgl. dagegen *Yamanouchi*, Über die Wirkung der Atoxyls auf Trypanosoma im Organismus. Paris (1910). — *Levaditi* et *Mc Intosh*, Le mécanisme de la transformation de l'atoxyl en trypanotoxyl. Comptes rend. de la Soc. Biol. **67**. 444, 569 (1910).

[4]) *Röhl*, Über den Wirkungsmechanismus des Atoxyls. Berliner klin. Wochenschr. **46**. 494 (1909). — Derselbe, Paraminophenylarsenoxyd contra Trypanotoxyl. Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. exp. Therapie. **2**. 496 (1909).

[5]) *Breinl* und *Nierenstein*, Zum Mechanismus der Atoxylwirkung. Ibid. **1**. 620 (1909). — *Nierenstein*, Über die Ausscheidung des Atoxyls im Pferdeharn. Ibid. **2**. 453 (1909).

Breinl und *Nierenstein* wiesen nach, daß nur in jenen Fällen, in denen anorganisches Arsen in der filtrierten respektive dialysierten Leber-Atoxylmischung nachgewiesen werden konnte, dieselbe auch einen deutlichen trypanozoiden Einfluß im Deckglaspräparate ausübte, während bei Abwesenheit dieses die Mischung Trypanosomen gar nicht beeinflußte.

Die Aktivierung des Atoxyls gelingt auch nach *Friedberger*[1] mittelst Thioglykolsäure.

Nauss und *Yorke*[2]) haben vor kurzem gefunden, daß die Trypanosomen Hämoglobin reduzieren. Die Reduktion hängt von der Trypanosomenzahl und Vitalität derselben ab. Für ihre Versuche verwenden sie gleiche Mengen trypanosomenhaltigen Plasmas und Hämoglobins.

Sorgfältig gewaschene Kaninchenerythrozyten[3] werden mit destilliertem Wasser hämolysiert und mit Kochsalz isotonisch gemacht. Hierbei entsteht ein schwacher Niederschlag, der abzentrifugiert wird. Die Trypanosomensuspension bereiten sie durch Verdünnen von trypanosomenhaltigem Blut mit einer Lösung, die aus 1% Natriumzitrat und 0.9% Natriumchlorid besteht. Das Verdünnungsverhalten ist 1 : 4. Hierauf wird zentrifugiert, das trypanosomenhaltige Plasma abgehoben und der Trypanosomengehalt mittelst einem Thoma-Zeiss-Hämozytometer[3] bestimmt. Der Reduktionsverlauf wird im Vergleichungsspektroskop (Zeiss) bestimmt.[4] Es findet zuerst eine Verdunkelung zwischen den Linien *D* und *E* statt, wobei *D* eine Verschiebung ins Rote erleidet. Mit der Zeit verschwinden die beiden Oxyhämoglobinlinien, wobei dann die charakteristische Methämoglobinlinie auftritt. Auch Methylenblau wird durch die Trypanosomen reduziert (*Nauss* und *Yorke*).

Nauss und *Yorke* haben auch die Blutgase, die durch Einwirken der Trypanosomen auf Hämoglobin entstehen, quantitativ bestimmt und hierbei festgestellt, daß der freie Sauerstoffgehalt abnimmt, ohne daß hierbei der Kohlensäuregehalt zunimmt. Je 3 cm^3 defibrinierten Blutes, dessen Hämoglobingehalt quantitativ bestimmt worden ist, werden bei 10—12° 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf wird eine Portion in den nebenstehenden Apparat eingeführt, auf 37° C eine Stunde lang erwärmt, die Gase ausgepumpt und quantitativ untersucht. Zum zweiten Teil wird eine ge-

[1]) *Friedberger*, Über die Behandlung der experimentellen Nagana mit Mischungen von Atoxyl und Thioglykolsäure. Berliner klin. Wochenschr. 45, 1714 (1908).

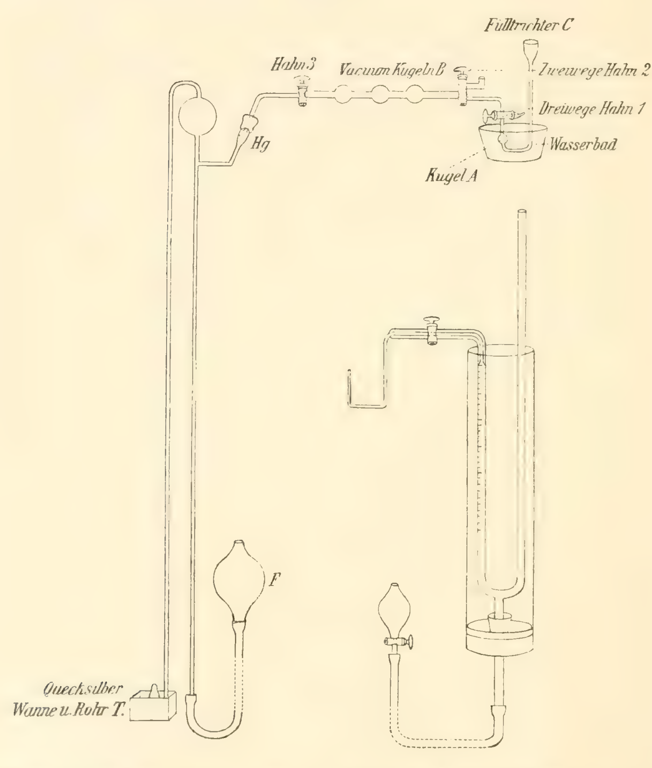
[2]) *R. W. Nauss* and *W. Yorke*, Reducing action of Trypanosomes on Haemoglobin. Ann. trop. med. and parasit. 5. 199 (1911). — *A. Bagshawe* (Bulletin Sleeping Sickness Bureau. 3. 412 [1911]) weist darauf hin, daß die Tatsache, daß die Trypanosomen Hämoglobin und Methylenblau reduzieren (*Nauss* und *Yorke*), gegen die *Ehrlich*sche Reduktionstheorie spricht. Die Trypanosomen würden solchen Falles das Atoxyl in vitro reduzieren und so aktivieren, dieses ist aber bekanntlich nicht der Fall. *Bagshawe* sieht hierin einen Beweis zu Gunsten der Oxydationstheorie von *Breinl* und *Nierenstein* (vgl. oben). — Vgl. auch *Nierenstein*, Zum Chemismus der Atoxyl (p-Aminophenylarsinsäure)-Wirkung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., 44, 3563 [1911].

[3]) Vgl. hierzu dieses Handbuch. Bd. 5. S. 22—22 (1911).

[4]) Vgl. hierzu dieses Handbuch. Bd. 3. S. 707—741 (1910).

messene Menge trypanosomenhaltiges Plasma hinzugefügt und hierauf wie oben verfahren. Der dritte Teil wird mit derselben Menge normalen Plasmas versetzt und die hierbei entstandenen Gase bestimmt. Die Apparatur ist aus der umstehenden Zeichnung leicht zu ersehen (Fig. 307). Der Teil zwischen den Hähnen *1* und *2* wird mit Hg gefüllt und die beiden Hähne abgeschlossen. Hierauf führt man mittelst des Zweiwegehahns 0·5 cm^3 1°/₀ige Phosphorsäure ein, pumpt mittelst Quecksilberpumpe die Luft aus und

Fig. 307.



schließt die beiden Hähne *2* und *3*. Mittelst des Fülltrichters *C* wird das Blutplasma eingeführt und mit Hg abgeschlossen. Hierauf erwärmt man die Kugel, die das Plasma enthält, öffnet vorsichtig und pumpt die entweichenden Gase ins Sammelrohr *T*. Für die Analyse der Gase dient der zweite Apparat der Zeichnung.

Reagentien zum Nachweis der biologisch wichtigen Verbindungen.

Von **L. Pincussohn**, Berlin.

1. Reagentien zur Bestimmung der Kohlenhydrate.

Hydrazine.

Die Hydrazine spielen bei der Analyse der Zucker eine wichtige Rolle. Sowohl dem Phenylhydrazin wie seinen Substitutionsprodukten kommt für die quantitative Bestimmung der Zuckerarten erhebliche Bedeutung zu. Näheres s. unten. Vgl. ferner die Ausführungen von *Tollens* in diesem Handbuch, Bd. 2, S. 57.

```
                                          H
                                          C
                                     HC       CH
Phenylhydrazin      H
                       N—C                    CH
C6 H5 . NH . NH2    H2N
                                          C
                                          H
```

Phenylhydrazin $C_6H_5 . NH . NH_2$

stellt eine farblose, ölige Flüssigkeit dar, die sich an der Luft durch Oxydation leicht bräunt. Wird beim Abkühlen fest, um bei 19·6° wieder zu schmelzen. Siedepunkt unter gewöhnlichem Druck 241°, wobei es sich in geringem Maße zersetzt. Es zeigt wie alle Hydrazine starke Reduktionsfähigkeit, reduziert *Fehling*sche Lösung schon in der Kälte. Durch energische Oxydation wird es in Anilin und Ammoniak gespalten, durch gelinde Oxydation des Sulfalts mittelst Quecksilberoxyd wird es in Diazobenzolsulfat übergeführt.

Phenylhydrazin entsteht durch Reduktion von Diazoniumsalzen. Durch Reduktion von Diazobenzolchlorid mit der berechneten Menge Zinnchlorür und Salzsäure entsteht salzsaures Phenylhydrazin, in Salzsäure schwer lösliche Blättchen von der Formel $C_6H_5 . N : N . Cl + 4H = C_6H_5 . NH . NH_2 . HCl$. Nach einem anderen Verfahren wird das Diazoniumsalz mit schwefligsaurem Natrium in diazobenzolsulfosaures Natrium überführt, dieses reduziert und

endlich durch Kochen mit Salzsäure die Sulfogruppe abgespalten. Diese Reaktion geht nach folgenden Formeln vor sich:

a) $C_6H_5 . N_2Cl + Na_2SO_3 = C_6H_5N:NSO_3Na + NaCl$.

b) $C_6H_5N:NSO_3Na + 2H = C_6H_5NH.NH.SO_3Na$.

c) $C_6H_5NH.NHSO_3Na + H_2O = C_6H_5.NH.NH_2 + NaHSO_4$.

Nach der Vorschrift von *E. Fischer* wird Phenylhydrazin im Laboratorium dargestellt, indem 50 *g* Anilin in $2^1/_2$ Mol. konzentrierter Salzsäure und 300 *g* Wasser gelöst werden; nach gutem Abkühlen wird mit der berechneten Menge Natriumnitrit diazotiert, und die erhaltene Flüssigkeit in eine kalte, möglichst gesättigte Lösung von $2^1/_2$ Mol. Natriumsulfit (hergestellt aus der käuflichen, etwa $40^0/_0$ Natriumbisulfit haltigen Lösung durch Neutralisation mit Natronlauge) eingegossen. Die erhaltene Lösung wird im Abzug in einem großen Rundkolben auf einem Baboblech erwärmt, wobei keine Trübung eintreten darf, sodann wird Zinkstaub und etwas Essigsäure zugefügt, bis die Lösung farblos geworden ist, heiß filtriert und das Filtrat sofort in der Hitze mit $^1/_3$ Vol. rauchender Salzsäure vorsichtig versetzt. Der erhaltene Kristallbrei von salzsaurem Phenylhydrazin wird auf der Nutsche abgesaugt, das möglichst von der Mutterlauge befreite Salz mit überschüssiger Natronlauge durchgeschüttelt und im Scheidetrichter mit Äther versetzt, der die Base aufnimmt. Die ätherische Lösung wird 12 Stunden mit Kaliumkarbonat getrocknet, abfiltriert, und der beim Abdampfen des Filtrats bleibende Rückstand ohne Kapillare — da die Luft oxydierend wirkt — im Vakuum im Ölbad bei einer Temperatur von 120—140° und höchstens 12 *mm* Druck destilliert.

Das im Handel käufliche Produkt ist nicht ganz rein. Für gewöhnliche präparative Zwecke genügt es, die Base 1—2mal aus ungefähr dem gleichen Volumen reinen Äthers umzukristallisieren, zur Ausscheidung gut zu kühlen, da Phenylhydrazin schon bei 19° schmilzt, und auf der Nutsche scharf abzupressen. Es wird sodann unter einem Druck von 10—20 *mm* destilliert. Das so gewonnene Präparat muß farblos sein und muß sich in der 10fachen Menge eines Gemisches von 1 Teil $50^0/_0$iger Essigsäure und 9 Teilen Wasser völlig klar lösen.

Zur Bereitung der reinen Base wird nach *Fischer* das käufliche Produkt zuerst bei 15—20 *mm* Druck destilliert, dann 4mal durch Abkühlung zu etwa $90^0/_0$ kristallisiert und jedesmal der flüssig gebliebene Teil abgegossen. Der Rückstand wird in $^3/_4$ Teilen seines Vol. reinen, über Natrium getrockneten Äthers gelöst, in Kältemischung abgekühlt, die ausgeschiedenen Kristalle bei niederer Temperatur scharf abgenutscht und mit sehr wenig stark gekühltem Äther gewaschen. Endlich wird unter 0·5 *mm* Druck aus dem Ölbad destilliert; die erste Fraktion, die kleine Mengen von Wasser und Äther enthalten könnte, wird verworfen. Das so gereinigte Phenylhydrazin hat nur eine schwache Gelbfärbung, so daß einzelne Tropfen farblos erscheinen.

Phenylhydrazin ist gegen Luft sehr empfindlich; es ist daher ratsam, die Base in zugeschmolzenen Glasgefäßen aufzuheben.

Phenylhydrazin ebenso wie seine Substitutionsprodukte bildet mit einer großen Anzahl von Kohlenhydraten gut kristallisierende Verbindungen, und zwar zwei Reihen, je nachdem ein oder zwei Moleküle Phenylhydrazin mit einem Molekül des Kohlenhydrates in Verbindung treten. Es bilden sich so die Hydrazone bzw. Osazone nach folgendem Schema (Glukose):

$$CH_2(OH)[CH(OH)]_3 CH(OH)CHO + C_6H_5NH.NH_2 =$$
$$CH_2(OH)[CH(OH)]_3 CH(OH).CH:N.NH.C_6H_5 + H_2O$$

Wirkt auf das so gebildete Phenylhydrazon ein zweites Molekül Phenylhydrazin ein, so wird die eine Alkoholgruppe vorübergehend in Carbonyl verwandelt, welches nun das zweite Molekül Phenylhydrazin bindet, so daß das Phenylosazon

$$CH_2(OH)[CH(OH)]_3.C\ .\ CH$$

$$C_6H_5.HN.N \quad N.NH.C_6H_5$$ entsteht.

Zum Nachweis der Aldehyde, Ketone und Zuckerarten empfiehlt *Emil Fischer* eine Mischung, die aus gleichen Vol. Phenylhydrazin und 50%iger Essigsäure, verdünnt mit etwa der dreifachen Menge Wasser besteht. Die Mischung oxydiert sich beim Aufbewahren in schlecht verschlossenen Gefäßen, so daß es zweckmäßig ist, sie vor jedem Versuch frisch zu bereiten. Bei kleineren Proben, auch zum Nachweis des Traubenzuckers im Harn, fügt man zu der zu prüfenden Flüssigkeit einfach die gleiche Anzahl von Tropfen Phenylhydrazin und 50%iger Essigsäure.

Eine ganze Anzahl Zucker geben mit Phenylhydrazin charakteristische Derivate (s. unten). Besonders charakteristische Derivate siehe bei den einzelnen Zuckern.

Durch die Phenylhydrazone kann man Mannose und Dextrose leicht trennen: das Mannosephenylhydrazon ist in Wasser sehr schwer, das Dextrosephenylhydrazon leicht löslich.

Über Darstellung der Hydrazone und Osazone vgl. *Tollens*, dieses Handbuch, Bd. **2**, S. 57.

Verbindungen des **Phenylhydrazins** mit Kohlenhydraten.

a) Phenylhydrazone.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-phenylhydrazon, $C_{11}H_{16}N_2O_4$. Scheidet sich bei 20 Minuten langem Erwärmen einer Lösung von einem Teil Arabinose in einem Teil Wasser mit zwei Teilen Phenylhydrazin auf 100° in weißen Kristallen vom Schmelzpunkt 150—153° ab. Löslich bei 15° in 85 Teilen Wasser und in 75 Teilen absolutem Alkohol, in 30 Teilen Alkohol von 90%. Fast unlöslich in Äther und Benzol $\alpha_D = +2.5°$ in 80%igem Alkohol.

l-Xylose-phenylhydrazon, gelbliche, äußerst lösliche Kristalle.

d-Lyxose-phenylhydrazon, sehr leicht löslich in Wasser und Alkohol.

l-Ribose-phenylhydrazon. Kristalle vom Schmelzpunkt 154—155°, sehr leicht löslich in Wasser.

Rhamnose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}O_4N_2$. Bei Vermischen alkoholischer Lösungen der Komponenten oder beim mehrstündigen Stehen einer Mischung von einem Teil Rhamnose, einem Teil Wasser und einem Teil Phenylhydrazin. Farblose, feine Blättchen vom Schmelzpunkt 159°, mäßig löslich in Wasser und Alkohol, nicht löslich in Äther; $\alpha_D = + 54{\cdot}2°$, ohne Multirotation. Nach *Tanret* ist die Drehung in Alkohol von 80% (wahrscheinlich eine isomere Form) + 27°.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}N_2O_5$. Entsteht durch Einwirkung von einem Volumen Phenylhydrazin, einem Vol. 50%iger Essigsäure und drei Vol. Wasser oder einer Mischung von kristallisiertem Natriumacetat und salzsaurem Phenylhydrazin auf Traubenzucker. Zur Reinigung wird in ein wenig heißem Alkohol gelöst und vorsichtig mit Äther gefällt. Farblose, feine Nadeln oder mikroskopische Tafeln vom Schmelzpunkt 144—146°. Drehung $\alpha_D = - 66{\cdot}57°$ nach 25 Minuten; —52° nach 36 Stunden. Sehr leicht löslich in Wasser und heißem Alkohol, weshalb es zur Identifizierung des Traubenzuckers nicht benutzt wird; leicht löslich in kalter starker Salzsäure, fast unlöslich in Äther, Benzol und Chloroform. Durch Erhitzen im Wasserbade während kurzer Zeit mit überschüssigem Phenylhydrazin entsteht das Osazon. Glukose-Phenylhydrazon existiert nach *Skraup, Simon* und *Bénard* in zwei insomeren Formen; die andere hat den Schmelzpunkt 115—116° und auch anderes Drehungsvermögen; nach dem Lösen $\alpha_D 20 = - 15{\cdot}3°$, nach 12—15 Stunden = — 46·9°. Beide Hydrazone liefern das gleiche Phenylosazon.

d-Mannose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}N_2O_5$, scheidet sich auf Zusatz von Phenylhydrazin schon in der Kälte ab. Rhombische Tafeln, welche beim raschen Erhitzen bei 195—200°, bei langsamem Erhitzen bei 186—188° schmelzen. Löst sich leicht in heißem Wasser, Alkohol, verdünnter Salzsäure, unlöslich in Alkohol, Äther, Aceton und Benzol. Dreht in salzsaurer Lösung nach links, in 6%igem Pyridin nach rechts: $\alpha_D = + 26{\cdot}66°$. Konzentrierte Säuren spalten es schon in der Kälte; beim Kochen mit Formaldehyd oder Benzaldehyd tritt sehr glatt Zerlegung ein, wobei reine und sehr gut kristallisierende Lösungen von Mannose erhalten werden. Das Hydrazon reduziert kräftig heiße *Fehling*sche Lösung.

l-Mannose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}N_2O_5$, entsteht ebenfalls schon in der Kälte aus den Komponenten. Farblose Kristalle, bei raschem Erhitzen bei 195° schmelzend, in salzsaurer Lösung rechts drehend. Gut löslich in heißem Wasser.

d,l-Mannose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}N_2O_5$. Ebenfalls schon in der Kälte entstehend. Schmelzpunkt 195°.

l-Gulose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}O_5N_2$. Weiße Nadeln, die sich schon in der Kälte abscheiden, vom Schmelzpunkt 143°, löslich in Alkohol und heißem Wasser.

d,l-Gulose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{18}O_5N_2$, in Wasser und Alkohol wenig lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 157—159°.

d-Galaktose-phenylhydrazon. $C_{12}H_{18}O_5N_2$, scheidet sich aus einer Mischung von 5 *g* Galaktose, 3 *ccm* Wasser und 5 *g* Phenylhydrazin nach kurzer Zeit als dicker Brei aus. Aus Alkohol feine Nadeln vom Schmelzpunkt 158° bzw. 160—162°. Leicht löslich in heißem Alkohol und Wasser, mäßig löslich in kaltem Wasser und Pyridin, unlöslich in Äther und Chloroform. Linksdrehend: $\alpha_{D_{20}} = -21{\cdot}4°$; Drehung in Pyridin zuerst $+20{\cdot}54°$, abnehmend bis $+9{\cdot}34°$. Wird durch rauchende Salzsäure in die Komponenten zerlegt.

l-Galaktose-phenylhydrazon. $C_{12}H_{18}O_5N_2$, in kaltem Wasser schwer lösliche Kristalle vom Schmelzpunkt 158—160°. $\alpha_D = +21{\cdot}6°$.

d-Fruktose-phenylhydrazon. $C_{12}H_{18}O_5N_2$, weiße Nadeln, löslich in Wasser und heißem Alkohol. Dreht nach links.

d-Sorbose-phenylhydrazon. Linksdrehende Kristalle.

α-Rhamnohexose-phenylhydrazon, in Wasser leicht lösliche Kristallmasse.

Verbindungen mit Heptosen. α-Glukoheptose-phenylhydrazon, $C_{13}H_{20}O_6N_2$, weiße Nadeln, vom Schmelzpunkt 170°, löslich in Wasser, wenig in Alkohol, schwer in Äther.

β-Glukoheptose-phenylhydrazon, $C_{13}H_{20}O_6N_2$, Nadeln vom Schmelzpunkt 190—193°, löslich in Wasser, schwer in Alkohol.

d-Mannoheptose-phenylhydrazon. $C_{13}H_{20}O_6N_2$, in Wasser schwer lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 197—200°.

l-Mannoheptose-phenylhydrazon. $C_{13}H_{20}O_6N_2$, farblose Nadeln, in heißem Wasser löslich, bei 196° unter Zersetzung schmelzend.

d. l-Mannoheptose-phenylhydrazon. $C_{13}H_{20}O_6N_2$. Schmelzpunkt 175°.

α-Galaheptose-phenylhydrazon. $C_{13}H_{20}O_6N_2$, weiße Nadeln, in Wasser und Alkohol löslich, mit geringer Rechtsdrehung. Schmelzpunkt 200°. (205° Korr.)

Methylheptose-phenylhydrazon, $C_{14}H_{22}O_6N_2$, kristallisiert aus heißem Wasser in Nadeln, die bei 20° unter Zersetzung schmelzen.

Verbindungen mit Oktosen. α-Glukooktose-phenylhydrazon, $C_{14}H_{22}O_7N_2$, in Alkohol und Wasser schwer lösliche Nadeln und Prismen vom Schmelzpunkt 190°.

d-Mannooktose-phenylhydrazon. $C_{14}H_{22}O_7N_2$, in Wasser schwer lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 212°.

d-Galaoktose-phenylhydrazon, $C_{14}H_{22}O_7N_2$, in Wasser wenig lösliche Blättchen. Schmelzpunkt 200—205°.

Verbindungen mit Nonosen. α-Glukononose-phenylhydrazon, $C_{15}H_{24}O_8N_2$, in Wasser und Alkohol schwer lösliche Nadeln, unter Zersetzung bei 195—200° schmelzend.

d-Mannononose-phenylhydrazon. $C_{15}H_{24}O_8N_2$, weiße Nadeln, in warmem Wasser und Alkohol löslich, bei 223° schmelzend.

Verbindungen mit Polysacchariden. Cellose-phenylhydrazon, $C_{12}H_{22}O_{10}(N_2HC_6H_5)$. Hygroskopisches Pulver, das sich bei 90° zersetzt

Maltose-phenylhydrazon, $C_{18}H_{28}O_{10}N_2$, hygroskopische Nadeln, vom Schmelzpunkt 130° unter Zersetzung, rechtsdrehend, löst sich in Alkohol, schwer löslich in Essigäther.

Laktose-phenylhydrazon, $C_{18}H_{28}O_{10}N_2$, entsteht, wenn man zu einer erkalteten Lösung von einem Teil Milchzucker in einem Teil Wasser $^1/_2$ Teil Phenylhydrazin und zwei Vol. absoluten Alkohols zufügt und dann mit viel Äther fällt. Nach wiederholtem Umfällen gelblicher, linksdrehender Sirup, leicht löslich in Wasser und Alkohol, schwer löslich in trockenem Essigäther, unlöslich in Äther. Wird durch starke Salzsäure schon in der Kälte gespalten.

Melibiose-phenylhydrazon, $C_{18}H_{28}O_{10}N_2$, hellgelbe Nadeln, löslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol, unlöslich in Äther, Benzol und Chloroform. Schmelzpunkt 145°.

Mannatrisaccharid-phenylhydrazon, amorpher, gelber Körper, löslich in Wasser und Alkohol, wenig löslich in Essigester. $\alpha_D = + 21°$.

Glukuron-phenylhydrazon, $C_{12}H_{14}O_5N_2$, beim Kochen eines Gemisches von alkoholischer Phenylhydrazinlösung und heißer Glukuronlösung. Aus absolutem Alkohol gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 160°, unlöslich in Wasser, fast unlöslich in kaltem Alkohol und Äther, ziemlich löslich in 50%igem Alkohol. In der Wärme reduzierend.

b) Phenylosazone.

Verbindungen mit Diosen. Glykolaldehyd-phenylosazon, $C_{14}H_{14}N_4$. Schmelzpunkt 169°, rein aus Pyridin 179°. Leicht löslich in heißem Alkohol, Äther, Benzol, sehr schwer löslich in Wasser, Alkalien und verdünnten Säuren.

Verbindungen mit Triosen. Glycerinaldehyd-phenylosazon, $C_{15}H_{16}ON_4$, gelbe prismatische Blättchen, stark reduzierend. Schmelzpunkt 132°. Sehr leicht löslich in Alkohol, Äther, Essigäther, Eisessig, Aceton, leicht löslich in heißem Benzol.

Dioxyaceton-phenylosazon entspricht dem eben beschriebenen Körper.

Verbindungen mit Tetrosen. d-Erythrose-phenylosazon, $C_{16}H_{18}N_4O_2$, goldgelbe, optisch inaktive Nadeln, leicht zersetzlich, in Äther und Benzol löslich. Schmelzpunkt 166—168°.

l-Erythrose-phenylosazon entspricht genau der eben beschriebenen Verbindung.

l-Thyreose-phenylosazon, $C_{16}H_{18}N_4O_2$, gleichfalls identisch.

d-Erythrulose-phenylosazon, ebenfalls identisch.

Methyltetrose-phenylosazon, $C_{17}H_{20}N_4O_2$. Nadeln löslich in Alkohol, Benzol, Pyridin, wenig löslich in Wasser und Äther. Schmelzpunkt 173—174°.

Apiose-phenylosazon, $C_{17}H_{20}O_3N_4$, in Wasser und Alkohol lösliche gelbe Nadeln. Schmelzpunkt 156°.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-phenylosazon, $C_{17}H_{20}N_4O_3$, entsteht beim Kochen der Arabinose oder ihres Hydrazons

mit Phenylhydrazin. Ein Teil Arabinose wird mit zwei Teilen salzsaurem Phenylhydrazin, drei Teilen Natriumacetat und 20 Teilen Wasser im Wasserbad eine Stunde lang erhitzt, die voluminöse gelbe Masse wird mit kaltem Wasser gewaschen und aus heißem Wasser oder Aceton umkristallisiert. Schmelzpunkt 160° bei raschem Erhitzen. Unlöslich in kaltem Wasser, Äther, Benzol und Ligroin, löslich in heißem Wasser, Alkohol, Aceton und Pyridin.

Pyridinzusatz erhöht die Löslichkeit in anderen Lösungsmitteln. Dreht rechts; in Pyridin-Alkohol $\alpha_D = + 1° 10'$. Konzentrierte Salzsäure spaltet in Phenylhydrazin und das schwach rechtsdrehende Arabinoson. Sehr wichtige Reaktionen zum Nachweis der Arabinose.

d-Arabinose-phenylosazon, $C_{17} H_{20} N_4 O_3$. Nadeln vom Schmelzpunkt 162—163° (159—160°).

d,l-Arabinose-phenylosazon, $C_{17} H_{20} N_4 O_3$, gelbe Nadeln oder Prismen vom Schmelzpunkt 166—168°.

l-Xylose-phenylosazon, $C_{17} H_{20} N_4 O_3$, entsteht beim Kochen von Xyloselösung mit Phenylhydrazin. Hellgelbe, seidenglänzende Tafeln oder Nadeln. Schmelzpunkt nach Angaben verschiedener Autoren von 152—170°. Schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Äther und Aceton. Zeigt beständige Linksdrehung: $\alpha_D = -43{\cdot}36°$.

d,l-Xylose-phenylosazon $C_{17} H_{20} N_4 O_3$, in heißem Alkohol schwer lösliche gelbe Nadeln, bei 210—215° unter Zersetzung schmelzend.

d-Lyxose-phenylosazon ist identisch mit l-Xylose-phenylosazon.

l-Ribose-phenylosazon ist identisch mit l-Arabinose-phenylosazon.

d-Araboketose-phenylosazon ist identisch mit d-Arabinose-phenylosazon.

d,l-Xyloketose-phenylosazon ist identisch mit dl-Xylose-phenylosazon.

Fucose-phenylosazon, $C_{18} H_{22} O_3 N_4$, gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 177°.

Rhamnose-phenylosazon, $C_{18} H_{22} O_3 N_4$, scheidet sich beim Erwärmen von Rhamnose mit Phenylhydrazin in kurzer Zeit in reichlicher Menge aus. Gelbe Nadeln, bei 180° unter Zersetzung und Gasentwicklung schmelzend; unlöslich in Wasser, wenig löslich in Äther und Benzol, mäßig löslich in heißem Alkohol und Eisessig, leicht löslich in Aceton. Reduziert beim Kochen *Fehling*sche Lösung. Dreht in Pyridinalkohol $+ 1{\cdot}24°$. Wird durch starke Säuren in Phenylhydrazin und Rhamnoson gespalten.

Isorhamnose-phenylosazon ist mit dem vorstehenden identisch.

Chinovose-phenylosazon, $C_{18} H_{22} N_4 O_3$, gelbe Nadeln, Schmelzpunkt 193—194°. Mit rauchender Salzsäure entsteht das in heißem Eisessig lösliche, in Alkohol wenig lösliche Oson.

Rhodeose-phenylosazon, $C_{18} H_{22} N_4 O_3$, gelbe Kristalle, in Aceton, weniger in Alkohol löslich. Schmelzpunkt 176·5°.

Isorhodeose-phenylosazon, $C_{18} H_{22} N_4 O_3$, in Alkohol lösliche gelbe Prismen vom Schmelzpunkt 190°.

Glukose-phenylosazon. $C_{18}H_{22}N_4O_4$. Bildung vgl. S. 1388. Zur Darstellung werden ein Teil Glukose mit 20 Teilen Wasser mit einem Überschuß von Phenylhydrazin oder mit drei Teilen kristallisiertem Natriumacetat und zwei Teilen salzsaurem Phenylhydrazin im Wasserbad erwärmt; nach $1^1/_2$ Stunden ist die größte Menge des Osazons ausgefallen. Kugelige Aggregate oder in Büscheln gruppierte gelbe Nadeln, deren Schmelzpunkt nach den Angaben der verschiedenen Autoren zwischen 205° und 217° schwankt. Im Gegensatz zu dem in heißem Wasser gut löslichen unreinen Osazon ist das reine Osazon fast unlöslich in Wasser, ziemlich löslich in heißem Alkohol, siedendem Aceton, Pyridin und anderen zyklischen Aminen, wie Pyrrol, Piperidin, Chinolin, in Ammoniak und substituierten Ammoniaken, Harnstoff, Nitrilen, Amiden, Aminosäuren, Anisol. Wenig löslich oder unlöslich in Wasser, Alkali, kaltem Aceton und absolutem Alkohol. In heißem Wasser suspendiert wirkt das Glukosazon stark reduzierend. Drehung $\alpha_D = -0.50°$ in Alkohol, $-0.85°$ in Eisessig, $-1.50°$ in Pyridinalkohol. Bei der Spaltung durch starke Salzsäure wird das Glukoson, $C_6H_{10}O_6$, abgespalten. In der Kälte erstarrender, schwach linksdrehender Sirup, löslich in heißem Alkohol, unlöslich in Äther.

l-Glukose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$. In kaltem Wasser, Alkohol und in Äther schwer lösliche gelbe Nadeln, vom Schmelzpunkt 208°. Dreht in Eisessig gelöst stark nach rechts. Durch Spaltung mit konzentrierter Salzsäure entsteht das l-Glukoson, aus dem durch Reduktion Fruktose entsteht.

d,l-Glukose-phenylosazon. $C_{18}H_{22}N_4O_4$, scheidet sich bei mehrstündigem Kochen aus. Reingelbe feine Nadeln oder mikroskopische Prismen, die bei 210° sintern und bei 217° unter Zersetzung schmelzen. Ziemlich löslich in Eisessig, wenig löslich in Essigester und heißem Alkohol, fast unlöslich in Wasser, Äther und Benzol. Durch Spaltung mit 20 Teilen konzentrierter Salzsäure entsteht d,l-Gukoson, $C_6H_{10}O_6$, farbloser Sirup, in der Kälte amorph, das durch Reduktion mit Zink und Essigsäure d,l-Fruktose, mit Natriumamalgam d,l-Mannit liefert.

d-Mannose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$ ist identisch mit Glukose-phenylosazon.

l-Mannose-phenylosazon, identisch mit l-Glukose-phenylosazon.

d,l-Mannose-phenylosazon ist identisch mit dl-Glukose-phenylosazon.

d-Galaktose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$, derbe gelbe Nadeln, bei völliger Reinheit bei 180—182° sinternd, bei langsamem Erhitzen bei 188—191°, bei raschem Erhitzen bei 193—194—197° schmelzend. Nach neuesten Angaben *(Fischer)* Schmelzpunkt 188° korr. In Pyridinalkohol ist die Drehung $\alpha_D = +0.48°$. Durch Salzsäurespaltung entsteht Galaktose.

l-Galaktose-phenylosazon gleicht dem d-Galaktose-phenylosazon.

dl-Galaktose-phenylosazon, gelbliche Nadeln vom Schmelzpunkt 206° bei raschem Erhitzen.

d-Talose-phenylosazon ist identisch mit d-Galaktose-phenylosazon.

Lävulose-phenylosazon ist identisch mit Glukose-phenylosazon.

l-Fruktose-phenylosazon ist identisch mit l-Glukose phenylosazon.

d-Sorbose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 164°, löslich in warmem Alkohol und Aceton, wenig löslich in Wasser, unlöslich in Äther, Benzol und Chloroform. In Pyridinalkohol ist $\alpha_D = -0{\cdot}25°$, in Methylalkohol —6°.

l-Sorbose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$, Schmelzpunkt 156°. Leicht löslich in Wasser und Alkohol.

d-Tagatose-phenylosazon ist identisch mit d-Galaktose-phenylosazon.

l-Tagatose-phenylosazon ist identisch mit l-Galaktose-phenylosazon.

Galtose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$, in Wasser wenig lösliche Kristalle vom Schmelzpunkt 182°, $\alpha_D = +19°$.

d-Gulose-phenylosazon ist identisch mit d-Sorbose-phenylosazon.

l-Gulose-phenylosazon ist identisch mit l-Sorbose-phenylosazon.

dl-Gulose-phenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_4$, Kristalle vom Schmelzpunkt 157—159°, im Gegensatz zu den Osazonen der aktiven Komponenten in Wasser wenig löslich.

d-Idose-phenylosazon ist identisch mit d-Sorbose-phenylosazon.

l-Idose-phenylosazon ist identisch mit l-Sorbose-phenylosazon.

Rhamnohexose-phenylosazon (α oder β), Gelbe Nadeln, bei 200° schmelzend, löslich in Alkohol, nicht löslich in Wasser.

Verbindungen mit Heptosen. Glukoheptose-phenylosazon (α oder β), $C_{19}H_{24}O_5N_4$, goldgelbe Nadeln, sehr schwer löslich in Alkohol, fast unlöslich in Äther und Wasser. Schmelzpunkt 195°, $\alpha_D = +0{\cdot}50°$.

d-Mannoheptose-phenylosazon, $C_{19}H_{24}O_5N_4$, in Alkohol wenig, in Wasser und Äther fast nicht löslich, Schmelzpunkt 200°.

l-Mannoheptose-phenylosazon, $C_{19}H_{24}O_5N_4$, Schmelzpunkt 203°.

dl-Mannoheptose-phenylosazon, Schmelzpunkt 210°.

α-Galaheptose-phenylosazon, gelbe Nadeln bei 218° schmelzend.

Rhamnoheptose-phenylosazon, $C_{20}H_{26}O_5N_4$, Schmelzpunkt gegen 200°.

Verbindungen mit Oktosen. α-Glukooktose-phenylosazon, $C_{20}H_{26}O_6N_4$. In Wasser und Alkohol schwer löslich. Schmelzpunkt 210—212°.

d-Mannooktose-phenylosazon, $C_{20}H_{26}O_6N_4$, wenig lösliche Nadeln, Schmelzpunkt 223°.

Galaoktose-phenylosazon, $C_{20}H_{26}O_6N_4$, Schmelzpunkt 226—231°.

Rhamnooktose-phenylosazon, Schmelzpunkt 216°.

Verbindungen mit Nonosen. α-Glukononose-phenylosazon, $C_{21}H_{28}O_7N_4$, Schmelzpunkt 230—233°.

d-Mannononose-phenylosazon, $C_{21}H_{28}O_7N_4$, Schmelzpunkt gegen 217°.

Die Phenylosazone der Heptosen, Oktosen und Nonosen sind sämtlich in Wasser schwer oder gar nicht löslich, lösen sich auch mehr oder weniger schwer in Alkohol und Äther.

Verbindungen mit Polysacchariden. Turanose-phenylosazon. Lange gelbe Nadeln, bei 215—220° unter Zersetzung schmelzend. Leicht löslich in heißem Wasser, Alkohol, Essigsäure und Aceton, unlöslich in Äther.

Cellose-phenylosazon. Nadeln vom Schmelzpunkt 198°, löslich in absolutem Alkohol, weniger in verdünntem Alkohol, noch weniger in Äther.

Maltose-phenylosazon, $C_{24}H_{32}N_4O_9$, entsteht bei anhaltendem Kochen von Maltose mit Phenylhydrazin in quantitativer Ausbeute. Beim Erkalten sich abscheidende hellgelbe Nadeln, die bei 190—193° sintern, bei rascher Erhitzung bei 202°, 206°, 208° schmelzen. Fast unlöslich in kaltem Wasser, wenig löslich in heißem Wasser und in heißem Alkohol, unlöslich in Äther, löslich in 66%igem heißen Alkohol und in kaltem 50%igen Aceton. Bei Kristallisieren aus Wasser enthalten die Kristalle 5—8% Kristallwasser, das beim Stehen über Schwefelsäure entweicht. Drehung in Pyridin-Alkohol $\alpha_D = + 1\cdot50°$; in Eisessig *(Fischer)* Linksdrehung. Löst man einen Teil in 90—100 Teilen siedenden Wassers und kocht mit 0·8 Teilen Benzaldehyd eine halbe Stunde unter starkem Umrühren, behandelt das erkaltete Filtrat nach völligem Ausäthern des Benzaldehyds mit Tierkohle und dampft im Vakuum ein, so erhält man das Oson, durchscheinende farblose Masse, mit schwacher Rechtsdrehung, die durch Hefen-Maltoglykase in Traubenzucker und d-Glukoson aufgespalten wird.

Isomaltose-phenylosazon, $C_{24}H_{32}N_4O_9$, gelbe Nadeln bei 142° sinternd, bei 153° schmelzend *(Fischer)*; bei höchstens 145° schmelzend *(Ost)*. In Wasser leichter löslich als die Maltoseverbindung. Unlöslich in Äther, Aceton und wasserfreiem Essigester. $\alpha_D = -20°$.

Laktose-phenylosazon, $C_{24}H_{32}N_4O_9$. Aggregate kurzer gelber Prismen. Schmelzpunkt 200°, vollständig bei 212°. Ziemlich gut löslich in heißem Wasser und heißem Alkohol, leicht löslich in heißem Eisessig, unlöslich in Äther, Benzol und Chloroform. In essigsaurer Lösung linksdrehend, in Pyridin-Alkohol inaktiv. Durch Einwirkung eiskalter rauchender Salzsäure wird ein Oson erhalten, das bei der Hydrolyse d-Glukoson und d-Galaktose gibt.

Isolaktose-phenylosazon, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 190 bis 193°. Durch Behandlung mit Benzaldehyd entsteht das Oson.

Melibiose-phenylosazon, $C_{24}H_{32}N_4O_9$, aus heißem Wasser oder heißem Toluol umkristallisierte Warzen aus gelben feinen Nadeln, die bei 178—179° schmelzen und sich bei 181—183° unter Gasentwicklung zersetzen. Zersetzt sich bei 100° in 10 Stunden. Mäßig löslich in heißem Wasser, leicht löslich in heißem Alkohol, Aceton, Pyridin und konzentrierter Essigsäure, wenig löslich in Äther, Chloroform, Benzol, fast unlöslich in Ligroin. Durch Behandlung mit Benzaldehyd entsteht das schwach rechtsdrehende Melibioson.

Glukosido-galaktose-phenylosazon, hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 172—174°, in Wasser, Benzol, Toluol wenig löslich.

Galaktosido-galaktose-phenylosazon, $C_{24}H_{32}O_9N_4$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 173—175°, wenig löslich in Wasser, Benzol, Ligroin, Chloroform, löslich in Alkohol, Essigester, Aceton und Pyridin.

Mannatrisaccharid-phenylosazon, mikroskopische Nadeln, in Wasser ziemlich löslich, vom Schmelzpunkt 122°.

Glukuronsäure-phenylosazon, $C_{18}H_{20}O_5N_4$, bildet sich beim Stehenlassen von einem Mol. Glukuron, drei Mol. Phenylhydrazin und Essigsäure während einiger Tage bei 40°. Gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 200—205°, wenig löslich in Wasser und heißem Benzol, leicht löslich in Aceton, sehr leicht in Pyridin; in letzterem linksdrehend. Es ist dem Glukosazon sehr ähnlich. Aus dem Osazon bildet sich durch Erhitzen mit 1·2 Mol. Phenylhydrazin und der 20fachen Menge Alkohol das

Glukuronsäure-phenylhydrazid, schwer lösliche gelbe Nadeln, in Pyridinalkohol linksdrehend, bei 212° schmelzend. Es ist ebenfalls dem Glukosazon sehr ähnlich und eignet sich deshalb ebensowenig wie das Glukuronsäurephenylhydrazon zum Nachweis der Glukuronsäure.

p-Bromphenylhydrazin, $Br.C_6H_4.NH.NH_2$.

Nach der Darstellungsmethode von *Michaelis* feste kristallinische Flocken, die mit Äther extrahiert und aus heißem Wasser umkristallisiert werden. Schmelzpunkt des reinen Präparates 107—108°. Gut kristallisierte trockene Präparate halten sich, vor Luft und Licht geschützt, jahrelang unverändert. Verfärbte Präparate werden leicht durch Umkristallisieren aus Wasser gereinigt, wobei der erkaltenden Flüssigkeit zweckmäßig einige Tropfen Sodalösung zugefügt werden. Das p-Bromphenylhydrazin wird meist in essigsaurer Lösung angewandt.

Das Bromphenylhydrazin eignet sich zur Erkennung einiger Zucker besser als das Phenylhydrazin. Besonders wertvoll ist die p-Bromphenylhydrazinverbindung der l-Arabinose. Mit dieser kann man auch Arabinose und Ribose trennen. Zum qualitativen Nachweis der Arabinose dient eine frisch herzustellende Lösung von 1 Teil Bromphenylhydrazin, 3·5 Teilen 50%iger Essigsäure und 12 Teilen Wasser. In einer 1%igen Arabinoselösung tritt schon nach 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur Kristallisation auf, bei 1/2%igen Lösungen nach etwas längerer Zeit.

Zur Darstellung der Sorbose eignet sich am besten das p-Bromphenylsorbosazon.

Verbindungen des p-Bromphenylhydrazins mit Kohlenhydraten.

a) p-Bromphenylhydrazone.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-p-bromphenylhydrazon, $C_{11}H_{15}Br.N_2O_4 = C_5H_{10}O_4.N_2H.C_6H_4Br$. Aggregate feiner Nadeln, die beim Zusammenbringen von Arabinose mit dem Hydrazin und Essigsäure entstehen. Die Verbindung ist für die Arabinose charak-

teristisch und dient zur Identifizierung. Ziemlich leicht in 50%igem Alkohol löslich; schmilzt bei 162° unter Zersetzung.

d-Arabinose-bromphenylhydrazon. $C_{11}H_{15}BrO_4N_2$. Gut in Alkohol, wenig in Wasser lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 162°.

dl-Arabinose-bromphenylhydrazon, $C_{11}H_{15}BrO_4N_2$. Nadeln, löslich in Pyridin, wenig löslich in Wasser, Alkohol und Äther. Schmelzpunkt 160°.

l-Xylose-bromphenylhydrazon, $C_{11}H_{15}BrN_2O_4$, in Wasser lösliche Kristalle vom Schmelzpunkt 128°. $\alpha_D = -20° 49'$.

Fucose-bromphenylhydrazon, $C_{11}H_{15}BrN_2O_4$, Schuppen vom Schmelzpunkt 181—183°, die sich in 50%igem Alkohol lösen.

Rhamnose-bromphenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_4N_2Br$. In heißem Wasser löslich, schmilzt bei 160—167°.

Rhodeose-bromphenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_4N_2Br$, seidenglänzende Nadeln, in Alkohol löslich. Schmelzpunkt 180°.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-bromphenylhydrazon $C_{12}H_{17}O_5N_2Br$. Schmelzpunkt 147°; 164—166°. Drehung in 2%iger wässeriger Lösung — 44·27°, bei längerem Stehen zur Rechtsdrehung übergehend. In Wasser wenig, in Pyridin leicht löslich.

d-Mannose-bromphenylhydrazon. $C_{12}H_{17}N_2O_5Br$, seidenglänzende Tafeln, wenig löslich in heißem Wasser und Alkohol, Äther, Benzol, leicht löslich in heißem Eisessig. Schmelzpunkt 208—210°.

d-Galaktose-bromphenylhydrazon, $C_{12}H_{17}N_2O_5Br$. Unlöslich in Äther und kaltem Wasser. Schmelzpunkt 168°.

Verbindungen mit Heptosen. α-Glukoheptose-bromphenylhydrazon. $C_{13}H_{19}N_2O_6Br$. In Wasser und Alkohol nicht löslich. Schmelzpunkt 158°.

Glukuron-p-bromphenylhydrazon, $C_{12}H_{13}BrO_5N_2$. Aus Alkohol stark lichtbrechende quadratische Tafeln, die bei 142° unter Zersetzung schmelzen. Unlöslich in kaltem Wasser, wenig in Äther, besser in Alkohol.

b) Bromphenylosazone.

Verbindungen mit Triosen. Glycerinaldehyd-bromphenylosazon, $C_{15}H_{14}N_4Br_2O$. Schmelzpunkt 168°. Sehr leicht löslich in Äther, Aceton, Benzol, Eisessig, Pyridin, ziemlich löslich in heißem Alkohol. Reduziert stark.

Verbindungen mit Tetrosen. d-Erythrose-bromphenylosazon, $C_{16}H_{16}N_4O_2Br_2$, goldgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 195°.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-bromphenylosazon, $C_{17}H_{18}O_3N_4Br_2$. Aus Alkohol gelbe Nadeln, aus verdünntem Pyridin sechseckige Platten, die bei 185° sintern und bei 196—208° schmelzen. Leicht löslich in heißem Wasser, Alkohol, Aceton, Benzol, Äther, Pyridin, schwer löslich in kaltem Wasser, unlöslich in Ligroin. Drehung in Pyridin-Alkohol + 0° 28'.

dl-Arabinose-bromphenylosazon, $C_{17}H_{18}N_4O_3Br_2$, hellgelbe Nadeln bei 200—202° schmelzend.

l-Xylose-bromphenylosazon. $C_{17}H_{18}N_4O_3Br_2$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 208°; gleicht mit Ausnahme des fehlenden Drehungsvermögens der entsprechenden l-Arabinose-Verbindung.

Rhamnose-bromphenylosazon. $C_{18}H_{20}O_3N_4Br_2$, in verdünntem Alkohol und Benzol lösliche gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 215°.

Isorhodeose-bromphenylosazon. Kristalle vom Schmelzpunkt 183—184°.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-bromphenylosazon. $C_{18}H_{20}N_4O_4Br_2$. Sieht ähnlich dem Phenylosazon; gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 222°. α_D in Pyridinalkohol = −0·31°.

d-Sorbose-bromphenylosazon. $C_{18}H_{20}N_4O_4Br_2$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 181°. Schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser und den organischen Lösungsmitteln. Dreht nach rechts.

d-Gulose-bromphenylosazon mit dem vorigen identisch.

dl-Gulose-bromphenylosazon. Schmelzpunkt 180—183°.

Verbindungen mit Polysacchariden. Maltose-bromphenylosazon, $C_{24}H_{30}O_9N_4Br_2$. Bildet sich beim Stehenlassen einer alkoholischen Lösung von Maltose und p-Bromphenylhydrazin während mehrerer Tage bei 30—50°. Nadeln vom Schmelzpunkt 198°. Löslich in heißem Alkohol und Aceton, weniger in Essigester, Benzol, Chloroform, unlöslich in Äther und Ligroin.

Melibiose-bromphenylosazon. $C_{24}H_{30}O_9N_4Br_2$, wurde aus dem Melibioson als kristallisierte Masse gewonnen. Schmelzpunkt 181—182°.

Glukuronsäure-p-bromphenylhydrazid. $C_{12}H_{17}O_7N_2Br$, durch Kochen siedender Lösungen reinsten salzsauren Phenylhydrazins mit Natriumacetat und Glukuronsäure. Aus 60%igem Alkohol hellgelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 236°. α_D in Pyridinalkohol = −369°, ziemlich löslich in 60%igem Alkohol und heißem Eisessig, sonst sehr schwer löslich, besonders, abweichend von den Hydrazinverbindungen der Zuckerarten, fast unlöslich in absolutem Alkohol. Sehr charakteristisches Derivat, besonders geeignet zur Trennung der Glukuronsäure von Traubenzucker, Pentosen usw. bei Harnanalysen u. dgl.

Nitrophenylhydrazine, $NO_2 . C_6H_4 . NH . NH_2$.

I. m-Nitrophenylhydrazin, aus Alkohol feine, kanariengelbe, faserige Nädelchen vom Schmelzpunkte 93°. Zur Darstellung der Phenylhydrazone wird einige Zeit in alkoholischer Lösung erwärmt. Das salzsaure m-Nitrophenylhydrazin bildet kurze, durchsichtige, gelbe Tafeln, schwer löslich in kaltem Wasser und Alkohol.

II. p-Nitrophenylhydrazin. Aus Alkohol orangerote Blättchen und Nadeln; aus Ligroin Blättchen. Schmelzpunkt 157° unter Zersetzung. Das Chlorhydrat bildet bräunliche, orangerote Blättchen.

Die p-Nitrophenylhydrazinderivate zeichnen sich durch große Beständigkeit, gutes Kristallisationsvermögen und bequeme Löslichkeits-

verhältnisse aus. Zur Reinigung der Derivate dient Umkristallisieren aus Alkohol oder Lösen in Pyridin und Ausfällen mit Äther, Wasser oder Toluol. Eignet sich auch gut als mikrochemisches Reagens.

III. o-Nitrophenylhydrazin. Aus Benzol seidenglänzende, ziegelrote Nadeln. Schmelzpunkt 90°. Leicht löslich in heißem Wasser, schwer in kaltem Alkohol, Äther, Ligroin, Benzol. Ist ebenfalls zur Darstellung von Zuckerderivaten empfohlen worden, hat aber weniger Anwendung gefunden.

a) Nitrophenylhydrazone.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-p-nitrophenylhydrazon, $C_{11}H_{15}O_6N_3$. Schmelzpunkt 168°. In Alkohol wenig löslich. Drehung in einer Mischung gleicher Teile Methylalkohol und Pyridin $\alpha_D = + 48.3°$.

l-Arabinose-m-nitrophenylhydrazon. Schmelzpunkt 179—180°. Löslichkeit wie oben.

l-Arabinose-o-nitrophenylhydrazon, $C_{11}H_{15}O_6N_3$. Schmelzpunkt 180°.

l-Xylose-p-nitrophenylhydrazon, $C_{11}H_{15}O_6N_3$, gleicht völlig der Arabinoseverbindung. In Alkohol leicht lösliche gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 156°.

l-Xylose-m-nitrophenylhydrazon, $C_{11}H_{15}O_6N_3$, gelbe Kristalle, in Alkohol löslich, die unbestimmt gegen 130° schmelzen.

Rhamnose-p-nitrophenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_6N_3$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 186°. $\alpha_D = + 21.4°$.

Rhamnose-m-nitrophenylhydrazon. Schmelzpunkt 104—105°. Rotgelb.

Rhamnose-o-nitrophenylhydrazon. Schmelzpunkt 151°.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-p-nitrophenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_7N_3$, existiert in zwei Modifikationen. Die α-Form entsteht, wenn man eine Lösung von je 2 *g* Traubenzucker und Glukose in 30 *cm*³ 96°/₀igem Alkohol 10 Minuten lang erwärmt, den Alkohol kalt verdunsten läßt und den Rückstand aus Alkohol umkristallisiert. Gelbe Nadeln, in Alkohol wenig löslich. Schmelzpunkt 185°. α_D in Pyridin-Methylalkohol $= + 21.5°$. Die β-Form erhält man aus der eisessigsauren Lösung der Komponenten bei gewöhnlicher Temperatur. Aus Alkohol lange gelbe Nadeln. Schmelzpunkt 195°. $\alpha_D = - 128.7°$. Beide Hydrazone geben das gleiche Osazon.

Glukose-m-nitrophenylhydrazon, gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 115—116°.

Glukose-o-nitrophenylhydrazon. Schmelzpunkt 148°.

d-Mannose-p-nitrophenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_7N_3$, bildet ebenfalls zwei Formen. α-Form hat gelbe Kristalle. Schmelzpunkt 190°; fast unlöslich in Wasser; β-Form gelbe Nadeln, Schmelzpunkt 202°.

d-Mannose-m-nitrophenylhydrazon. Schmelzpunkt 162—163°.

d-Mannose-o-nitrophenylhydrazon. Schmelzpunkt 173°.

Glukuronsäure-p-nitrophenylhydrazon, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 225°, in heißem Wasser leicht löslich. $\alpha_D = -91 \cdot 2°$ in Pyridinalkohol.

d-Galaktose-m-nitrophenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_7N_3$, Schmelzpunkt 181—182°.

d-Galaktose-o-nitrophenylhydrazon, voluminöse Kristalle vom Schmelzpunkt 172°.

Lävulose-p-nitrophenylhydrazon, $C_{12}H_{17}O_7N_3$, aus der erwärmten alkoholischen Lösung der Komponenten gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 176°. α_D in Pyridin-Methylalkohol = + 16°.

Lävulose-o-nitrophenylhydrazon, in Methylalkohol lösliches ziegelrotes Pulver, Schmelzpunkt 155—156°.

b) Nitrophenylosazone.

Verbindungen vom Diosen. Glykolaldehyd-p-nitrophenylosazon, $C_{14}H_{12}N_6O_4$, aus Pyridin durch Fällung mit Toluol hellrote Nadeln vom Schmelzpunkt 311°. Löslich nur in heißem Nitrobenzol, Anilin, Pyridin, Chinolin und Benzonitril. Gibt mit alkoholischem Kali *Bamberger*sche Reaktion: tiefblaue Färbung.

Verbindungen mit Pentosen. Rhamnose-p-nitrophenylosazon, $C_{18}H_{20}O_7N_6$, entsteht durch kurzes Erwärmen von einem Teil Rhamnose mit vier Teilen Hydrazin und verdünnter Salzsäure. Aus Alkohol mikroskopische, zinnoberrote Nadeln, die bei 208° unter Zersetzung schmelzen. Löslich in Natronlauge mit tiefblauer Färbung, die bei schwachem Erwärmen dunkelviolett wird.

Verbindungen mit Hexosen. d-Galaktose-p-nitrophenylosazon, $C_{18}H_{20}O_8N_6$, entsteht aus den Komponenten in alkalischer oder saurer Lösung in einer Modifikation, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 192°. Drehung in einem Gemisch von gleichen Teilen Methylalkohol und Pyridin $\alpha_D = + 45 \cdot 6°$.

d-Glukose-p-nitrophenylosazon, $C_{18}H_{20}O_8N_6$, rote Nadeln vom Schmelzpunkt 257°, in Natronlauge mit dunkelblauer Farbe löslich. α_D in Pyridin-Methylalkohol = — 21·4°.

Glukose-m-nitrophenylosazon, rotbraunes Pulver vom Schmelzpunkt 228°, in Alkohol sehr schwer löslich.

Glukose-o-nitrophenylosazon, in Alkohol fast unlöslich. Schmelzpunkt 215—217°.

Lävulose-p-nitrophenylosazon, $C_{18}H_{20}O_8N_6$, ist identisch mit Glukose-p-nitrophenylosazon.

Verbindungen mit Polysacchariden. Maltose-p-nitrophenylosazon, $C_{24}H_{30}N_6O_{13}$, entsteht wie die analoge Verbindung des Traubenzuckers, der es völlig gleicht. Rote Nadeln. Schmelzpunkt 261° unter Zersetzung.

Laktose-p-nitrophenylosazon, $C_{24}H_{30}N_6O_{13}$, entsteht wie die analoge Traubenzuckerverbindung. Schmelzpunkt 258° unter Zersetzung. Löst sich in verdünnter Natronlauge mit kornblumenblauer Farbe.

Methylphenylhydrazin:

$$\frac{C_6H_5}{CH_3}\!>\!N.NH_2.$$

Siedepunkt 227° bei 745 *mm* unter schwacher Ammoniakentwicklung, bei 35 *mm* 131° (korr.). Es reduziert *Fehling*sche Lösung erst in der Wärme.

Nach *Neuberg* eignet es sich besonders zur Erkennung und Isolierung der Ketosen, die sonst mit Schwierigkeiten verknüpft ist. Es geben damit nur die Ketozucker ein Methylosazon, während die Aldosen und Aminozucker vom Typus des Chitosamins nur farblose Hydrazone geben. Von den Hydrazonen sind besonders charakteristisch die der Glukose und der Galaktose.

a) Hydrazone.

Verbindungen mit Triosen. Glycerinyldehyd-methylphenylhydrazon, $C_{10}H_{14}O_2N_2$, farblose Nadeln oder Platten, bei 120° schmelzend. Leicht löslich in Alkohol, Wasser, Benzol + Ligroin, Benzol, Toluol, sehr leicht löslich in warmem Pyridin.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-methylphenylhydrazon, $C_{12}H_{18}O_4N_2$, gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 164° oder 161°, leicht löslich in Alkohol und Pyridin, wenig löslich in Wasser, unlöslich in Äther. α_D in Alkohol = + 4·30°; in Eisessig α_D = — 21·8°; in Pyridin kein merkliches Drehungsvermögen.

d, l-Arabinose-methylphenylhydrazon, $C_{12}H_{18}O_4N_2$, aus Alkohol glänzende Blätter vom Schmelzpunkt 173°, leicht löslich in Wasser, Pyridin und heißem Alkohol, ziemlich leicht in Essigester, wenig löslich in kaltem Alkohol, Aceton und Chloroform, kaum löslich in Benzol und Schwefelkohlenstoff.

l-Xylose-methylphenylhydrazon, $C_{12}H_{18}O_4N_2$, gelbliche Kristalle vom Schmelzpunkt 108—110°, löslich in Wasser, Alkohol, Aceton, Essigester, Chloroform und Pyridin.

Fucose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}O_4N_2$, weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 177—179°. α_D in Pyridin = + 3·6°.

Rhamnose-α-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}O_4N_2$, weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 124°, wenig löslich in Wasser und Alkohol, löslich in reinem Methylalkohol. Etwas linksdrehend.

Rhodeose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}O_4N_2$, farblose Nadeln, Schmelzpunkt 181°, in heißem Wasser und Alkohol löslich.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}N_2O_5$, weiße langgestreckte Tafeln vom Schmelzpunkt 130°. Zur Darstellung wird die Lösung der Komponenten konzentriert, der eingedickte Sirup mit Alkohol angerührt und der Rückstand aus Alkohol umkristallisiert. Geht beim Kochen mit mehr Hydrazin nicht in das Osazon über.

d-Mannose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}N_2O_5$, weiße Kristalle, wenig löslich in Wasser und absolutem Alkohol, löslicher in Methylalkohol. Schmelzpunkt 178°. α_D in Methylalkohol = + 8·6°.

d-Galaktose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}N_2O_5$, weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 188—190°. Wenig löslich in Wasser, absolutem Alkohol, leicht löslich in absolutem Methylalkohol. Sehr gut zur Erkennung und Abscheidung der d-Galaktose geeignet.

l-Galaktose-methylphenylhydrazon, schon kristallisierend.

dl-Galaktose-methylphenylhydrazon, weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 183°, leicht löslich in heißem Wasser, schwer löslich in kaltem Wasser und anderen Lösungsmitteln.

d-Talose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}N_2O_5$, Schmelzpunkt 154°.

Lävulose-methylphenylhydrazon, $C_{13}H_{20}N_2O_5$, aus Alkohol Prismen, welche bei 116—120° unter Zersetzung schmelzen.

Verbindungen mit Heptosen. α-Glukoheptose-methylphenylhydrazon, $C_{14}H_{22}O_6N_2$, feine Nadeln vom Schmelzpunkt 150°.

b) Osazone.

Verbindungen mit Triosen. Dioxyaceton-methylphenylosazon, $C_{17}H_{20}N_4O$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 127—130°, sehr leicht löslich in Pyridin, leicht löslich in Alkohol, Aceton, Essigester, Benzol, unlöslich in Wasser und Ligroin.

Verbindungen mit Tetrosen. dl-Erythrulose-methylphenylosazon, $C_{18}H_{22}N_4O_2$, rotgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 158—159°, die sich beim Aufbewahren zersetzen, leicht löslich in organischen Lösungsmitteln.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-methylphenylosazon, $C_{20}H_{26}N_4O_4$, entsteht aus Glukose und Hydrazin in Alkohollösung unter Essigsäurezusatz nach 48stündigem Stehen und darauffolgendem Erwärmen nach Zusatz von Alkohol und Äther. Es entsteht leicht aus Lävulose (d-Fruktose) und ist deswegen besser als Fruktose-methylphenylosazon anzusehen. Schmelzpunkt 142—153°.

Fruktose-methylphenylosazon (Lävulose-methylphenylosazon), $C_{20}H_{26}N_4O_4$. Eine Lösung von 1·8 *g* Fruktose in 10 *cm*³ Wasser wird mit 4 *g* Methylphenylhydrazin und Alkohol zur klaren Lösung versetzt und 4 *cm*³ 50%iger Essigsäure zugefügt. Es wird 5—10 Minuten höchstens auf dem Wasserbad erwärmt. Nach längstens 2 Stunden scheiden sich in reichlicher Ausbeute rötliche Kristalle aus, Nadeln vom Schmelzpunkt 158—160°, löslich in Pyridin, etwas löslich in heißem Alkohol, Aceton, Benzol, Chloroform, sehr wenig löslich in Wasser, kaltem Alkohol, Benzol und Äther, unlöslich in Ligroin. Drehung in Pyridinalkohol: $\alpha_D = +1{\cdot}66°$ $(1{\cdot}40°)$. Dieses Osazon ist für die Fruktose höchst charakteristisch.

dl-Fruktose-methylphenylosazon, $C_{20}H_{26}N_4O_4$, rotgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 158°.

d-Sorbose-methylphenylosazon, $C_{20}H_{26}N_4O_4$, in Alkohol lösliches gelbrotes Öl.

dl-Tagatose-methylphenylosazon, $C_{20}H_{26}N_4O_4$, Schmelzpunkt 148—150°. In organischen Lösungsmitteln löslich.

Äthylphenylhydrazin:

$$\frac{C_6H_5}{C_2H_5} > N.NH_2.$$

Unzersetzt flüchtiges Öl vom Siedepunkt 237. Spezif. Gew. 1·018. Es reduziert *Fehling*sche Lösung erst in der Wärme.

a) Hydrazone.

l-Arabinose-äthylphenylhydrazon. $C_{13}H_{20}O_4N_2$. in Wasser und Alkohol wenig lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 153°. α_D in Eisessig = —24·6°.

Rhamnose-α-äthylphenylhydrazon. $C_{14}H_{22}O_4N_2$. in absolutem Methylalkohol lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 123°. α_D in Methylalkohol = —11·6°.

Rhodeose-äthylphenylhydrazon. $C_{14}H_{22}O_4N_2$. farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 193°, in 96%igem Alkohol löslich.

d-Mannose-äthylphenylhydrazon $C_{14}H_{22}O_5N_2$. Schmelzpunkt 159°. α_D in Methylalkohol = + 14·6°.

d-Galaktose-α-äthylphenylhydrazon. $C_{14}H_{22}O_5N_2$. in Wasser und Alkohol wenig lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 169°. In Methylalkohol optisch inaktiv.

Amylphenylhydrazin:

$$\frac{C_6H_5}{C_5H_{11}} > N.NH_2.$$

Hydrazone.

l-Arabinose-amylphenylhydrazon $C_{16}H_{26}O_4N_2$. gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 120°. in Methylalkohol löslich. In Methylalkohol gelöst inaktiv; in Eisessig α_D = + 2·8°.

d-Arabinose-amylphenylhydrazon. in Wasser und Alkohol löslich. Schmelzpunkt 115°.

Rhamnose-α-amylphenylhydrazon. $C_{17}H_{28}O_4N_2$. hellbraune Kristalle vom Schmelzpunkt 99°. α_D = —6·4° in Methylalkohol.

Glukose-α-amylphenylhydrazon. $C_{17}H_{28}O_5N_2$. hellbraune Nadeln vom Schmelzpunkt 128°. wenig löslich in Wasser und Alkohol. Drehung in Methylalkohol α_D = —6·4°.

d-Mannose-α-amylphenylhydrazon. $C_{17}H_{28}O_5N_2$. hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 134°, in Wasser schwer löslich. α_D in Methylalkohol = + 9·2°.

d-Galaktose-α-amylphenylhydrazon. $C_{17}H_{28}O_5N_2$. hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 116° (127—128°). wenig löslich in Wasser und absolutem Alkohol; leichter in Methylalkohol: darin α_D = + 4·4°.

Laktose-α-amylphenylhydrazon. hellbraune Nadeln vom Schmelzpunkt 123°. α_D = —8·6° in Methylalkohol.

Allylphenylhydrazin:

$$\frac{C_6H_5}{C_3H_5} > N.NH_2.$$

Es bildet ein Öl, das unzersetzt bei 177° unter 109·5 *mm* Druck siedet. Es reduziert *Fehling*sche Lösung langsam in der Kälte, rasch in

der Wärme. Wässeriges Kaliumchromat färbt es nicht rot. Das Chlorhydrat bildet in Wasser leicht lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 137°.

l-Arabinose-allylphenylhydrazin $C_{14}H_{20}N_2O_4$, hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 145°. In Eisessig α_D — 2·4°.

Rhamnose-α-allylphenylhydrazon. Schmelzpunkt 1[illegible]5°, optisch inaktiv.

Glukose-α-allylphenylhydrazon $C_{15}H_{22}O_5N_2$. Schmelzpunkt 155° α_D = — 5·3° in Methylalkohol.

d-Galaktose-α-Allylphenylhydrazon. Schmelzpunkt 157°, α_D in Methylalkohol = — 8·6°.

Laktose-α-allylphenylhydrazon. Schmelzpunkt 132°, α_D in Methylalkohol — 14·6°.

Melibiose-allylphenylhydrazon. Hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 197°. Wenig löslich in Wasser, besser in absolutem Alkohol, leicht in Methylalkohol. α_D in Methylalkohol = + 21·2°; in Eisessig: α_D = + 8°.

Benzylphenylhydrazin:

$$\begin{matrix} C_6H_5 \\ C_7H_7 \end{matrix} > N \cdot NH_2.$$

Schweres, schwach bräunlich gefärbtes Öl, bei 38 *mm* Druck zwischen 216 und 218° unzersetzt destillierend. Ist in verdünnter Salzsäure unvollkommen löslich. Darstellung erfolgt aus Phenylhydrazin und Benzylchlorid. Benzylphenylhydrazin-Chlorhydrat. Schmelzpunkt 166—167°. Beim Stehen geht das Benzylphenylhydrazin partiell in Benzalbenzylphenylhydrazin (Schmelzpunkt 111°) über. Benzylphenylhydrazin bildet mit Zucker sehr schwer lösliche Hydrazone. Diese werden mit Formaldehyd gespalten. Zum Nachweis besonders geeignet ist das Hydrazon der l-Arabinose.

a) Hydrazone.

Verbindungen mit Tetrosen. d-Erythrose-benzylphenylhydrazon. $C_{17}H_{20}N_2O_3$. Nadeln vom Schmelzpunkt 105·5°, leicht löslich in Alkohol und heißem Benzol. $\alpha_D 20$ = — 32° in Alkohol.

l-Erythrose-benzylphenylhydrazon, in heißem Benzol lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 105°. $\alpha_D 20$ = + 32·8° in Alkohol.

l-Threose-benzylphenylhydrazon. Nadeln vom Schmelzpunkt 194·5°.

Methyltetrose-benzylphenylhydrazon. $C_{18}H_{22}N_2O_3$. Schmelzpunkt 96—97°.

Verbindungen mit Pentosen. l-Arabinose-benzylphenylhydrazon. $C_{18}H_{22}N_2O_4$, weiße Nadeln. Schmelzpunkt 170°, α_D in Methylalkohol = — 12·1°, in Eisessig = — 14·6°.

d-Arabinose-benzylphenylhydrazon, fast unlöslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol. Schmelzpunkt 179°, α_D = + 14·6° in Methylalkohol.

dl-Arabinose-benzylphenylhydrazon, hellgelbe Nadeln bei 185° schmelzend, leicht löslich in Pyridin, löslich in heißem Wasser, Alkohol und Chloroform, wenig löslich in Äther, Benzol, Ligroin.

l-Xylose-benzylphenylhydrazon, Nadeln vom Schmelzpunkt 93°, sehr schwer löslich in Wasser, leicht in Äther, sehr leicht in Alkohol. $\alpha_D = -33°$ in Alkohol.

d-Lyxose-benzylphenylhydrazon. Schmelzpunkt 116° aus Benzol; 128° aus Alkohol.

Fucose-benzylphenylhydrazon. $C_{19}H_{24}O_4N_2$. Schmelzpunkt 173°; 179°.

Rhamnose-α-benzylphenylhydrazon, hellgelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 121°. Löslich in absolutem Alkohol, leichter in Methylalkohol. α_D in Alkohol $= -6{\cdot}4°$, in Eisessig: $\alpha_D = -2{\cdot}1°$.

Rhodeose-benzylphenylhydrazon, $C_{19}H_{24}O_4N_2$, weiße Nadeln, bei 179° schmelzend.

Verbindungen mit Hexosen. Glukose-α-benzylphenylhydrazon, $C_{19}H_{24}O_5N_2$, hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 165°, wenig löslich in Alkohol und Methylalkohol, löslich in Pyridin, unlöslich in Wasser. α_D in Methylalkohol = 33°, in Eisessig $-20{\cdot}2°$, in Pyridin $-46{\cdot}33°$, beim Stehen steigend auf 48·16°.

d-Mannose-benzylphenylhydrazon, weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 165°, schwer löslich in Wasser, Alkohol, Methylalkohol, leicht löslich in Eisessig; in letzterem α_D = 10·6°; in Methylalkohol $= +29{\cdot}8°$.

d-Galaktose-α-benzylphenylhydrazon, hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 154—158°, wenig löslich in Wasser und Alkohol, etwas löslich in Methylalkohol. α_D in Methylalkohol $= -17{\cdot}2°$, in Pyridin $= -14{\cdot}63°$.

Verbindungen mit Polysacchariden.

Laktose-α-benzylphenylhydrazon, $C_{25}H_{34}N_2O_{10}$, hellgelbe Nadeln, bei 128° schmelzend, in Alkohol wenig löslich. In Methylalkohol $\alpha_D = -25{\cdot}7°$.

Glukuron-benzylphenylhydrazon, $C_{19}H_{20}O_6N_2$, fällt beim Erwärmen der Komponenten auf 80° aus. Aus heißem 90%igen Alkohol lange seidenglänzende weiße Nadeln, bei 141° unter Zersetzung schmelzend. Sehr schwer löslich in Wasser, wenig in kaltem, besser in heißem Alkohol. Kaliumsalz: farblose Nadeln. Schmelzpunkt 176—178°. $\alpha_D = -20{\cdot}29°$.

b) Osazone.

Verbindungen mit Diosen. Glykolaldehyd-benzylphenylosazon, $C_{28}H_{26}N_4$, gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 197·5°.

Verbindungen mit Hexosen. Fruktose-benzylphenylosazon, $C_{32}H_{34}N_4O_4$, unrein gelatinöse Masse, in reinem Zustande hellgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 190°. Löslich in heißem Alkohol, Aceton, Benzol und Pyridin, wenig löslich in Wasser und kaltem Alkohol. In Pyridinalkohol ist $\alpha_D = -1°32'$.

Diphenylhydrazin:

$$\begin{matrix} C_6H_5 \\ C_6H_5 \end{matrix} > N . NH_2.$$

Darstellung aus Diphenylamin über das Nitrosamin durch Behandlung des letzteren mit Zinkstaub und Eisessig. Das so erhaltene Diphenylhydrazinchlorhydrat bildet ganz farblose feine Nadeln, aus denen mit Natronlauge die Base abgeschieden wird. Farblose Tafeln vom Schmelzpunkt 34—35°. Siedepunkt 220° bei 40—50 *mm*. Sehr schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und Äther. Wirkt infolge seiner schweren Löslichkeit selbst bei Siedetemperatur kaum auf *Fehling*sche Lösung.

Es verbindet sich im Gegensatz zum Phenylhydrazin in der Kälte erst nach längerem Stehen, in der Wärme rascher mit den gewöhnlichen Zuckerarten und liefert gut kristallisierende, beständige und in Wasser schwer lösliche Hydrazone. Die Base ist in Wasser und Essigsäure schwer löslich, es werden daher alkoholische Lösungen für die Reaktionen benutzt. Charakteristisch sind die Diphenylhydrazone der l-Arabinose, auch zur Trennung von anderen Zuckern geeignet, ferner der Glukose.

Besonders vorteilhaft ist die Verbindung zur Erkennung des Traubenzuckers, hauptsächlich zur Trennung von Glukose und Lävulose; aus dem Gemisch der Phenylhydrazone kann man das Glukosediphenylhydrazon durch Zusatz von Äther abscheiden. Zur Trennung der Glukose von Mannose und Galaktose ist es nicht brauchbar.

a) Hydrazone.

Rhamnose-diphenylhydrazon, $C_{18}H_{22}N_2O_4$, aus einem Teil Rhamnose und 1½ Teilen Diphenylhydrazin. Kleine Prismen vom Schmelzpunkt 134°, in Wasser und Alkohol löslich.

Rhodeose-diphenylhydrazon, in Alkohol schwer lösliche weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 199°.

l-Arabinose-diphenylhydrazon, $C_{17}H_{20}O_4N_2$, bildet sich aus den Komponenten schnell in der Wärme, langsam in der Kälte. Weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 216—218° beim schnellen Erhitzen. Es ist das schwerstlösliche Derivat der Arabinose und daher zur Identifizierung und Trennung besonders geeignet.

dl-Arabinose-diphenylhydrazon, $C_{17}H_{20}O_4N_2$, bildet weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 206°, die ebenfalls wegen der Schwerlöslichkeit in Wasser sich zur Abscheidung gut eignen. Wenig löslich auch in Chloroform und Alkohol, löslich in Eisessig und Pyridin.

d-Glukose-diphenylhydrazon, $C_{18}H_{22}O_5N_2$, farblose, kleine, schiefe Prismen oder seidenglänzende Kristalle vom Schmelzpunkt 161°, leicht löslich in Wasser und heißem Alkohol, unlöslich in Äther und Chloroform und Benzol. Wirkt beim Kochen stark reduzierend. Ermöglicht einen sehr sicheren Nachweis des Traubenzuckers, insbesondere bei Gegenwart von anderen Zuckerarten, z. B. der Fruktose.

l-Glukose-diphenylhydrazon, $C_{18}H_{22}O_5N_2$, feine Nadeln vom Schmelzpunkt 162°, wenig löslich in kaltem Wasser, leicht löslich in heißem Wasser.

dl-Glukose-diphenylhydrazon, farblose Kristalle, bei 132—133° schmelzend.

d-Mannose-diphenylhydrazon, schwer lösliche Kristalle vom Schmelzpunkt 155°, die für Mannose sehr charakteristisch sind.

α-Glukoheptose-diphenylhydrazon, $C_{19}H_{24}N_2O_6$, in Alkohol und Äther unlösliche weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 140°.

Glukosamin-diphenylhydrazon, $C_{18}H_{23}N_3O_4$, entsteht beim Stehenlassen äquivalenter Mengen von Glukosaminchlorhydrat, alkoholischer Kalilauge, nach Einleiten trockener Kohlensäure und Versetzen der abgegossenen Lösung mit Diphenylhydrazin. Lange farblose Nadeln, die sich bei 140° bräunen und bei 162° unter Zersetzung schmelzen. Unlöslich in Alkohol, Äther und Chloroform, in warmem Wasser unter Zersetzung löslich.

Glukuron-diphenylhydrazon, $C_{18}H_{18}O_5N_2$, weiße Nadeln vom Schmelzpunkt 150°, leicht löslich in heißem Alkohol, sonst fast unlöslich.

β-Naphthylhydrazin:

$$\begin{matrix} H \\ C_{10}H_7 \end{matrix}\!\!>N.NH_2.$$

Die Darstellung erfolgt aus Naphthylamin. Aus der heißen Lösung des Chlorhydrats wird die Base mit Natriumkarbonat oder Natriumbikarbonat gefällt. Farblose, glänzende Blättchen vom Schmelzpunkt 124—125°, ziemlich schwer löslich in Äther, leicht löslich in heißem Alkohol, Benzol, Chloroform. Es ist ebenso wie seine Derivate, besonders in feuchtem Zustande, lichtempfindlich. An der Luft oxydiert es langsam unter Rotfärbung. Das Chlorhydrat ist beständiger. Die β-Naphthylhydrazone der Zuckerarten zeichnen sich durch große Kristallisationsfähigkeit und Schwerlöslichkeit aus. Es entstehen jedoch wahrscheinlich zwei Formen, und zwar stereiisomere Produkte nach den Formeln

$$\begin{matrix} C_5H_{11}O_5\ .\ CH \\ \| \\ N.NHC_{10}H_7 \end{matrix} \quad \text{und} \quad \begin{matrix} C_5H_{11}O_5\ .\ CH \\ \| \\ C_{10}H_7HN-N \end{matrix}$$

In schwach saurer Lösung bilden sich die Naphthylhydrazone der labileren Form mit größerer Löslichkeit, niedrigerem Schmelzpunkt und leichterer Zersetzlichkeit. Die Naphthylhydrazone werden durch Formaldehyd oder Benzaldehyd gespalten.

Hydrazone.

l-Arabinose-naphthylhydrazon $C_{15}H_{18}O_4N_2$, braune Nadeln vom Schmelzpunkt 141°, wenig löslich in Wasser und 96%igem Alkohol, löslich

in absolutem Methylalkohol. In diesem gelöst $\alpha_D = + 22·5°$, in Eisessig $\alpha_D = + 7°$. Die schwer löslichere Form schmilzt bei 176—177°, weiße Nadeln.

l-Xylose-naphthylhydrazon. Ebenfalls zwei Verbindungen beschrieben. I. Braune Nadeln vom Schmelzpunkt 70°, α_D in Eisessig $= + 15·8°$; in absolutem Methylalkohol $= + 18·6°$. II. Weiße Kristalle vom Schmelzpunkt 123—124°, kaum löslich in Äther, Chloroform und Benzol, wenig in Essigester, ziemlich löslich in Alkohol, erheblich mehr als die analogen Verbindungen der Arabinose, Glukose und Galaktose.

Rhamnose-naphthylhydrazon, braune Nadeln vom Schmelzpunkt 170°, schwer löslich in Wasser und 96%igem Alkohol, leicht löslich in absolutem Methylalkohol. α_D in absolutem Alkohol $= + 8·4°$, in Eisessig $= — 11·8°$.

Glukose-naphthylhydrazon, $C_{16}H_{20}O_5N_2$, braune Nadeln vom Schmelzpunkt 95°, in Wasser und 96%igem Alkohol wenig, in reinem Methylalkohol leicht löslich. Darin $\alpha_D = + 10·2°$, in Eisessig inaktiv. Ferner ist eine zweite Verbindung beschrieben, die bei 179° schmilzt, leicht löslich in heißem Alkohol, unlöslich in Äther ist.

d-Mannose-naphthylhydrazon, $C_{16}H_{20}O_5N_2$, braune Kristalle vom Schmelzpunkt 157°, wenig löslich in Wasser und absolutem Alkohol, besser in Eisessig und Methylalkohol. In Methylalkohol $\alpha_D = + 16·8°$, in Eisessig inaktiv.

Andere Modifikation: mikroskopische Nadeln vom Schmelzpunkt 180°, in kaltem Alkohol etwas löslich.

d-Galaktose-naphthylhydrazon, braune Nadeln vom Schmelzpunkt 167°, etwas löslich in Wasser und 96%igem Alkohol, leicht in Methylalkohol; in diesem $\alpha_D = + 24·8°$, in Eisessig $\alpha_D = + 2°$. Ein anderes Produkt stellt weiße, in feuchtem Zustand lichtempfindliche Warzen dar, die bei 190° schmelzen. Sehr schwer löslich in kaltem 96%igen Alkohol, leicht löslich in heißem Alkohol, unlöslich in Äther. α_D in Methylalkohol $= + 10°$.

Fruktose-naphthylhydrazon, ebenfalls zwei Formen erhalten. 1. gelbliche, in Alkohol leicht lösliche Masse, die zweite schwieriger löslich mit höherem Schmelzpunkt. Nach anderen Angaben nur eine Form, gelbliche Nadeln, Schmelzpunkt 162°, sehr leicht löslich in Alkohol, Methylalkohol und Aceton.

Maltose-naphthylhydrazon, hellbraune Kristallmasse vom Schmelzpunkt 176°, wenig löslich in Wasser, leicht löslich in Methylalkohol. In diesem $\alpha_D = + 10·6°$.

Melibiose-naphthylhydrazon, bräunliche Nadeln bei 155° schmelzend, fast unlöslich in Wasser, wenig löslich in Alkohol, löslich in Methylalkohol. In diesem $\alpha_D = + 15·9°$.

2. Andere Zuckerreagentien.

Phenol, Oxybenzol, Carbolsäure, C_6H_5OH:

```
        CH
     ╱    ╲
  HC        CH
   |        |
   |        |
  HC        C.OH
     ╲    ╱
        CH
```

Findet sich unter anderem im Steinkohlenteer, aus dem es auch dargestellt wird. Farblose Kristallmasse, aus langen Nadeln bestehend, Schmelzpunkt 40—42°, Siedepunkt 181°. Spezifisches Gewicht 1·084. Sehr leicht löslich in Alkohol, Äther, Chloroform, Glycerin und Schwefelkohlenstoff. Bei 16° in 15 Teilen Wasser löslich. Die Lösung gibt auf Zusatz von Eisenchloridlösung eine blaue Färbung. Bromwasser erzeugt noch in einer Lösung von 1 Teil Phenol auf 50.000 Teile Wasser einen weißen, flockigen Niederschlag. Ein mit Salzsäure befeuchteter Fichtenspan wird durch Phenol grünblau gefärbt. *Millons* Reagens gibt beim Kochen mit Phenol einen gelben Niederschlag, der sich in Salpetersäure mit tiefroter Farbe löst. Phenol soll in dunkelgefärbten Flaschen aufbewahrt werden.

Phenol gibt mit verschiedenen Zuckern Färbungen, besonders mit Glukose. Diese gibt mit Phenol und Salzsäure eine violette Färbung, die mit Salpetersäure blutrot, mit Kalilauge weingelb wird.

Uffelmanns Reagens, eine amethystblaue Lösung, die durch Zusatz weniger Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung zu einer 2—5%igen Carbolsäurelösung hergestellt wird, wird durch Milchsäure, nicht aber durch Salzsäure oder flüchtige fette Säuren zeisiggelb gefärbt.

Brenzkatechin, o-dioxybenzol, $C_6H_4(OH)_2$:

```
       C.OH
  HC        C.OH
  HC        CH
       CH
```

Es entsteht aus einer Anzahl von Harzen durch Kalischmelze. Darstellung aus dem Guajakol, dem Monomethyläther, durch Erhitzen mit Jodwasserstoff. Weiße rhombische Prismen, in Wasser, Alkohol und Äther leicht löslich. Schmelzpunkt 104°. Es ist unzersetzt sublimierbar. Brenzkatechin besitzt stark reduzierende Eigenschaften. In alkalischer Lösung ist es sehr unbeständig; diese färbt sich an der Luft erst grün und dann schwarz.

Die wässerige Lösung wird auf Zusatz von Eisenchlorid smaragdgrün, bei Zugabe von Natriumbikarbonat violettrot.

Brenzkatechin gibt mit einigen Kohlenhydraten charakteristische Färbungen. Traubenzucker: mit konzentrierter Salzsäure und Brenzkatechin zinnoberrote Färbung. Die gleiche Reaktion tritt auf, wenn man statt des

Brenzkatechins Guajakol $C_6H_4\begin{matrix}O.CH_3 & (1)\\ OH & (2)\end{matrix}$ verwendet. Gleiche Reaktion auch mit Kresol, $C_6H_4(CH_3)OH$.

Resorcin, m-dioxybenzol, $C_6H_4(OH)_2$.

$$\begin{matrix} & C.OH & \\ H.C & & C.H \\ H.C & & C.OH \\ & C.H & \end{matrix}$$

Entsteht aus manchen Harzen durch schmelzendes Kali; technisch wird es durch Kalischmelze von m-Phenylendisulfosäure $C_6H_4\begin{matrix}SO_3H(1)\\ SO_3H(3)\end{matrix}$ dargestellt. Farblose oder schwach gefärbte Kristalle von sehr schwachem, eigenartigem Geruch und süßlich kratzendem Geschmack. Es ist in Wasser, Alkohol, Äther und Glycerin leicht, in Chloroform und Schwefelkohlenstoff schwer löslich. Beim Erwärmen verflüchtigt es sich vollständig. Schmelzpunkt 110—111°, des wasserfreien Produktes 118°. Am Licht und an der Luft bräunen sich die Kristalle wie auch die Lösungen leicht; es ist daher vor Licht geschützt aufzubewahren. Eisenchlorid gibt mit Resorcin eine dunkelviolette Färbung. Die wässerige Lösung (1 : 20) wird durch Bleiessig weiß gefällt. Bei vorsichtigem Erwärmen von 0·05 g Resorcin mit 0·1 g Weinsäure und 10 Tropfen Schwefelsäure erhält man eine dunkelkarminrote Flüssigkeit.

Resorcin soll möglichst geruchlos sein. Ein tieferer Schmelzpunkt als 110° deutet auf Verunreinigung. Beim Erhitzen müssen sich einige Gramm Resorcin völlig verflüchtigen. Die wässerige Lösung des Resorcins soll ungefärbt sein, sie soll Lackmuspapier nicht verändern und darf beim Erwärmen keinen Phenolgeruch verbreiten. Fällung mit Bleiacetat spricht für Brenzkatechin, Auftreten von Chinongeruch beim Erwärmen mit Eisenchlorid für Hydrochinon. Zur quantitativen Bestimmung des Resorcins versetzt man eine Lösung von bekanntem Gehalt mit titriertem Bromwasser und bestimmt das überschüssige Brom zurück.

Resorcin ist ein Aldehydreagens. Kocht man einige Tropfen der zu untersuchenden Substanz mit einer Resorcinlösung der Zusammensetzung 1 Teil Resorcin, 2 Teile absoluter Alkohol, 2 Tropfen konzentrierter Salzsäure eine Minute lang und gießt das Produkt in Wasser, so beweist ein entstehender Niederschlag die Gegenwart der Aldehydgruppe. Die Reaktion tritt oft schon bei Stehen in der Kälte ein. Wichtig ist die von *Seliwanoff* gefundene Reaktion, nach der Ketosen und Zuckerarten, welche Ketosen abzuspalten vermögen, beim Erwärmen mit der halben Gewichtsmenge Resorcin, etwas Wasser und konzentrierter Salzsäure eine tiefrote Färbung und weiter Fällung eines braunroten, in Alkohol löslichen Farbstoffes geben.

Die Reaktion ist besonders wertvoll zum Nachweis der Fruktose (s. d. Handbuch, Bd. 2, S. 109). Resorcin eignet sich ferner zum Nachweis des Dioxyacetons und damit des Glycerins, welches leicht in Dioxyaceton übergeführt wird. 0·1 *cm*³ einer 0·5%igen Resorcinlösung mit 0·4 *cm*³ der zu untersuchenden Flüssigkeit und 2 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure gibt nach Erhitzen im siedenden Wasserbad eine rotgelbe oder gelbe Färbung mit je einem Absorptionsband im Blau und im Gelb (*Denigès*, C. r. d. l'Acad. d. sc., 148. p. 570, 1909). Fucose gibt Gelbfärbung. Methylfurol, das bei der Destillation mit verdünnten Säuren aus Methylpentosen entsteht, gibt karmoisinrote Färbung. Ferner gibt Glukose die *Seliwanoff*sche Reaktion. Die Reaktion ist ferner brauchbar für den Nachweis des Rohrzuckers (feuerrote Färbung).

Es dient ferner als Reagens auf verholzte Zellmembrane, auf Chloral und Chloroform, zum Nachweis der freien Salzsäure im Magensaft. Eine Lösung von 1 *g* Resorcin in 100 *g* Wasser und 10 Tropfen Schwefelsäure ist ein scharfes Reagens auf salpetrige Säure.

Pyrogallol, 1, 2, 3-Trioxybenzol, $C_6H_3(OH)_3$:

```
         COH
       /     \
   H.C         COH
      |        |
   H.C         COH
       \     /
         C.H
```

Es wird durch Erhitzen von Gallussäure gewonnen, wobei Kohlensäure abgespalten wird. Sehr leichte, weiße, glänzende Blättchen, leicht löslich in Wasser, Alkohol und Äther. Schmelzpunkt 132°. Pyrogallol sublimiert bei vorsichtigem Erhitzen ohne Rückstand. Die Lösung gibt mit Eisenchlorid braune Färbung, die auf Sodazusatz rotviolett wird. Mit Bleiacetat entstehen schwer lösliche kristallinische Fällungen. Auf Zusatz einer Spur Jod zu einer Pyrogallollösung wird diese purpurrot gefärbt. Pyrogallol ist ein sehr starkes Reduktionsmittel, daher seine Verwendung als „Entwickler" in der Photographie, ferner bei Gasanalysen. Eine wässerige alkalische Pyrogallollösung unter Braunfärbung absorbiert sehr lebhaft Sauerstoff. Pyrogallol muß vor Licht geschützt in gut verschlossenen, dunklen Gefäßen aufbewahrt werden.

Die Lösung des Pyrogallols in 2 Teilen Wasser muß klar, neutral und farblos sein. Der Körper gibt auch mit Äther und Alkohol klare Lösungen. 1 *g* muß bei vorsichtigem Erhitzen ohne Rückstand sublimieren.

Mit einer Reihe von Kohlenhydraten entstehen Färbungen. Arabinose: mit Pyrogallol und Zusatz von Salz- oder Schwefelsäure tritt bei vorsichtigem Erwärmen gelbrote Färbung auf. Traubenzucker: mit Pyrogallol und starker Salzsäure hochrote bis braunrote Färbung. Formose: rote, harzige Flocken, ohne daß diese Reaktion für Formose charakteristisch wäre. Rohrzucker: weinrote Färbung.

Phloroglucin, 1.3.5-Trioxybenzol $C_6H_3(OH)_3$.

```
           H
           C
HO.C            C.OH
 H.C            C.H
          C.OH
```

Es entsteht aus verschiedenen Harzen sowie aus Resorcin durch Kalischmelze, ferner durch Spaltung aus dem Phloretin, das wiederum ein Spaltprodukt des Glukosids Phlorizin darstellt. Große verwitternde Prismen, die unzersetzt sublimieren. Schmelzpunkt 218°. Es wird durch Eisenchlorid dunkelviolett gefärbt.

Phloroglucin ist bisweilen mit Diresorcin verunreinigt. Zur Prüfung darauf werden einige Milligramm mit zirka 1 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure übergossen, 1—2 *cm*³ Essigsäureanhydrid zugefügt und 5—10 Minuten im Wasserbad erwärmt. Ist das Phloroglucin rein, so tritt gelbe bis gelbbraune Färbung auf; bei auch nur sehr geringem Diresorcingehalt färbt sich die Flüssigkeit violett.

Diese Färbung ist schon bei 0·4% Diresorcin sehr deutlich. Ein geringer Diresorcingehalt im Phloroglucin ist nicht zu beanstanden, da es die üblichen Reaktionen nicht stört.

Durch Lösen von 2 *g* Phloroglucin und 1 *g* Vanillin in 30 *g* Alkohol erhält man Phloroglucinvanillin, das unter dem Namen *Günzburg*sches Reagens zum Nachweis der freien Salzsäure im Magensaft dient. Phloroglucin ist ferner Reagens auf Lignin: Rotfärbung mit Phloroglucin und Salzsäure im Gegensatz zur Zellulose.

Phloroglucin dient besonders als Reagens für Pentosen und Glukuronsäure (vgl. dieses Handbuch, Bd. 2, S. 95 ff.). Über Anstellung der Reaktion, die unter Zugabe von Salzsäure erfolgt, die Extraktionsmethode mit Amylalkohol, die Absatzmethode von *Tollens* und die spektroskopische Untersuchung vgl. *Tollens*, dieses Handbuch, Bd. 2, S. 95 ff.

Bei Ausschütteln des bei der Probe mit Glycerose erhaltenen Farbstoffes zeigt das Spektrum einen im Verhältnis zu den anderen Zuckerarten bedeutend schwächeren und undeutlicheren Absorptionsstreifen zwischen D und E. Ähnlich reagiert Dioxyaceton; zur Erkennung von Glycerose von Dioxyaceton vgl. die Methode von *Wohl* und *Neuberg*, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. **33**, S. 3095. Arabinose gibt mit Phloroglucin eine cochenille- bis kirschrote Färbung. Über die besondere Eignung der Absatzmethode s. bei *Tollens*. Das gleiche gilt für den Nachweis der Xylose. Gibt kirschrote Färbung, die erst beim Erhitzen deutlich wird. Die Reaktion eignet sich ebenfalls für den Nachweis der Lyxose. Phloroglucin und Salzsäure gibt mit Fruktose eine eigenartige gelbbraunliche Lösung. Es reagiert ferner mit Rhamnose. Fucose gibt Gelbfärbung, aber nicht das Absorptionsspektrum der Pentosen.

Orcin, 1, 3, 5-Dioxytoluol, $C_6H_3(CH_3)(OH)_2$:

```
          H
          C
  HO.C ⁄    ⁄ C.OH
     |      |
    HC      CH
        ⁄
          C
          |
          CH3
```

Findet sich in vielen Flechten, in Roccella peruensis, Roccella Montagnei und R. tinctoria. Es entsteht aus Orsellinsäure durch Kohlensäureabspaltung, durch Schmelzen von Aloëextrakt mit Kali, synthetisch herstellbar ist es unter anderem aus Toluol. Farblose, sich leicht rötende Prismen von süßlichem Geschmack. Schmelzpunkt 100—101°.

Die wässerige Lösung wird durch Eisenchlorid blauviolett gefärbt. Das Orcin dient vor allem zum Nachweis der Pentosen und der Glukuronsäure. Über die Reaktion, besonders mit der Absatzmethode, und das Orcinreagens nach *Bial* vgl. *Tollens* (l. c. S. 97).

Glycerinaldehyd gibt mit Orcin und Salzsäure erst rote, dann violette und blaugrüne Färbung, sodann blaugrüne Flocken. Diese geben in Amylalkohol gelöst im Spektrum einen Streifen zwischen D und C. Dioxyaceton gibt dieselbe Reaktion. Arabinose: spektroskopisch Streifen zwischen C und D. Durch Zusatz von Eisenchlorid wird die Reaktion gesteigert; die Lösung zeigt dann nach Erhitzen zwei Spektralstreifen, einen im Rot und einen auf der Natriumlinie. Xylose: Reaktion entspricht genau der Arabinose. Lyxose: desgleichen. Rhamnose: desgleichen. Glukose: mit Salzsäure und 0·1% Orcin gelbe bis gelbrote Farbe, die in Alkohol mit grüner Fluoreszenz löslich ist. Glukoheptose: gibt mit Orcin eine ähnliche Farben- und Spektralreaktion wie die Pentosen. Glukuronsäure: beim Kochen mit in Salzsäure gelöstem Orcin Grünfärbung ähnlich den Pentosen. 1 Tropfen Eisenchlorid verstärkt die Reaktion. Spektroskopisch ein dunkles Band im Rot zwischen B und C und eines auf der Natriumlinie.

Menthol, $C_{10}H_{20}O$:

```
          CH3
          CH
   H2C        CH2
   H2C        CH OH
          CH
          CH
      CH3  CH3
```

kommt im Pfefferminzöl vor und wird aus diesem dargestellt. Spitze, spröde, farblose Kristalle, bei 43° schmelzend, bei 212° siedend. Leicht löslich in

Äther. Alkohol und Chloroform, sehr schwer löslich in Wasser. Es gibt mit 40 Teilen Schwefelsäure eine braunrote, trübe, sich später klärende Flüssigkeit. Menthol ist ein sekundärer Alkohol; durch Oxydation mit Chromsäuregemisch geht er in einen ketonähnlichen Körper, das Menthon über. Beim Erhitzen mit Kupfersulfat entsteht Cymol.

Menthol gibt mit verschiedenen Kohlenhydraten Färbungen. Traubenzucker: mit Menthol und konzentrierter Schwefelsäure gesättigt kirschrot violette Färbung; Rohrzucker: rosenrote Farbe.

Thymol, $C_{10}H_{14}O = CH_3 . C_6H_3 . OH . CH(CH_3)_2$.

Findet sich im Thymianöl. Farblose, durchsichtige Kristalle von aromatischem Geruch, bei 50—51° schmelzend, bei 228—230° siedend. Leicht löslich in Alkohol, Äther und Chloroform, sehr schwer löslich in Wasser. Mit Wasserdämpfen leicht flüchtig.

In 4 Teilen Schwefelsäure löst es sich in der Kälte mit gelblicher, bei gelindem Erwärmen mit rosenroter Farbe. Die Lösung vom Thymol in Essigsäure wird auf Zusatz von 6 Tropfen Schwefelsäure und 1 Tropfen Salpetersäure schön blaugrün gefärbt. Die Lösung des Thymols in Wasser darf mit Eisenchloridlösung nicht violett gefärbt werden. Bei Zusatz von Bromwasser tritt milchige Trübung auf.

Thymol gibt mit verschiedenen Zuckern Farbenreaktionen. Dioxyaceton (zugleich Nachweis des in Dioxyaceton übergeführten Glycerins): 0·1 cm^3 einer 0·5%igen alkoholischen Thymollösung + 0·4 cm^3 der zu untersuchenden Flüssigkeit und 2 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure geben nach Erhitzen im Wasserbad weinrote bis rosarote Färbung. Rhamnose gibt mit Schwefelsäure und Thymol carmoisinrote Färbung; Glukose: zinnoberrote Färbung. Rohrzucker: gleiche Reaktion.

α-Naphthol, $C_{10}H_7OH$:

```
       H    H
       C    C
          C
  H.C           C.H

  H.C           C.H
          C
       C    C.OH
       H
```

Findet sich im Steinkohlenteer. Es wird dargestellt durch Kalischmelze aus den Naphthalinsulfosäuren, ferner durch Diazotierung des Naphthylamins. Die gleiche Darstellungsweise gilt für das β-Naphthol. Beide Naphthole zeigen große Analogie mit dem Phenol. Phenolartig riechende, glänzende Blättchen, schwer löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Alkohol und Äther. Schmelzpunkt 95°, Siedepunkt 288°. Die Naphthole zeigen jedoch

ziemlich erhebliche Ähnlichkeit mit den Alkoholen, ihre Hydroxylgruppe ist ziemlich reaktionsfähig und läßt sich zum Beispiel gegen die Aminogruppe austauschen. Gibt mit Eisenchlorid violette Flocken, die sich in Äther mit blauer Farbe lösen.

Es wird benutzt zu der Reaktion von *Molisch* zum Zuckernachweis in 15—20%iger alkoholischer Lösung, und zwar für die Schichtreaktion (s. d. Handbuch, Bd. **2**, S. 93); durch Versetzen von $\frac{1}{2}$ -1 cm^3 der Zucker-, Kohlenhydrat- oder Glykosidlösung mit 2 Tropfen der Naphthollösung und Zufügen konzentrierter Schwefelsäure im Überschuß entsteht sofort bei Monosen und Diosen, nach kurzem Erwärmen bei Polyosen eine tiefviolette Färbung, nach Zufügen von Wasser ein blauvioletter Niederschlag, der sich in Alkalien, Alkohol und Äther mit gelber Farbe auflöst. Manche Substanzen geben mit Schwefelsäure allein eine ähnliche Färbung, z. B. Eugenol und Anethol.

Zur Prüfung auf Verunreinigungen erhitzt man 1 *g* Naphthol: es darf kein Rückstand hinterbleiben. Die Kristalle des reinen Naphthols sind farblos. Außer dem reinen Produkt, dem Naphthol recryst. albiss., kommt noch ein technisches Produkt in den Handel, das aus geschmolzenen, kristallinischen Massen besteht und stets β-Naphthol enthält, und das als Reagens nicht geeignet ist.

Mit α-Naphthol reagiert Glykolose, Glycerose, Dioxyaceton, dl-Erythrose mit blauvioletter Farbe. Arabinose reagiert mit roter beim Verdünnen mit Wasser beständiger Farbe. Ferner findet Reaktion statt mit d-Lyxose; Rhamnose gibt violettblaue Färbung. Glukose gibt violette Färbung, die auf Wasserzusatz blauviolett wird; das Spektrum hat ein Absorptionsband im Grün. Glycerinaldehyd gibt bei der Schichtprobe einen violetten Ring. Methylfurol gibt karmoisinrote Färbung. (Nachweis von Methylpentosen, die beim Destillieren mit verdünnten Säuren Methylfurol geben.) Die Reaktionen der Mannose, der Sorbinose und der Fruktose stimmen mit denen des Traubenzuckers überein. Rohrzucker gibt mit α-Naphthol und Schwefelsäure eine rotviolette bis stark violettblaue Färbung; Milchzucker gibt violette Farbe.

Die Reaktion ist auch mikrochemisch brauchbar. Bei Aufbringen eines Tropfens der Naphthollösung und 2—3 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf das zu untersuchende Präparat tritt die Reaktion nur bei Vorhandensein fertig gebildeter Zucker sofort ein, während sie sich bei Anwesenheit höherer Komplexe nur langsam vollzieht.

β-Naphthol, $C_{10}H_7OH$.

Vorkommen und Bildung wie bei α-Naphthol. Nach Phenol riechende glänzende Blättchen, bei 122° schmelzend und bei 288° siedend. Gibt mit Eisenchlorid gelbgrüne Färbung. Gibt ebenfalls mit verschiedenen Zuckern charakteristische Farbenreaktionen. 0·1 cm^3 einer 2%igen alkoholischen β-Naphthollösung mit 0·4 cm^3 einer dioxyacetonhaltigen Flüssigkeit und

2 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure gibt nach Erhitzen im siedenden Wasserbad smaragdgrüne Färbung mit gleicher Fluoreszenz und einem Absorptionsband in Grün und Rot. (Glycerinnachweis: dieses muß zunächst durch Erhitzen mit der 100fachen Menge 0·5%igen Bromwassers in Dioxyaceton übergeführt werden.) Weitere Reaktionen: Arabinose gibt lichtgelbe Farbe. Glukose + alkoholisches β-Naphthol gibt gelbgrüne Färbung mit grüner Fluoreszenz. Rohrzucker gibt gelbgrün fluoreszierende Färbung. Milchzucker eine rein gelbe Farbe.

Naphthoresorcin (1 : 3 Dioxynaphthalin), $C_{10}H_6(OH)_2$:

```
           OH
      H
      C     C
        C   1
HC 7          2 CH

HC 6          C.OH
        C  4
      C     C
      H     H
```

Über die Reaktion mit Naphthoresorcin und Salzsäure vgl. bei *Tollens*, d. Handbuch, Bd. 2, S. 93 ff. Es entsteht bei Vorhandensein von Arabinose grüne Fluoreszenz und schwache Bänder im Grün des Spektrums, mit Xylose genau gleiche Reaktion. Fucose: violettblaue Lösung mit grüner Fluoreszenz und je einem Band auf der D-Linie und im Grün. Rhamnose ähnliche Reaktion. Glukose und Mannose: schwache Rotfärbung, schwach grüne Fluoreszenz, Bänder im Grün. Galaktose und diese enthaltende Zuckerarten: je ein Band im Grün und auf der D-Linie. Fruktose hindert die Reaktion und muß daher durch Kochen mit Salzsäure zerstört werden. Fruktose: tiefpurpurrote Färbung mit schwach grüner Fluoreszenz, die Färbung wird mit Alkohol gelbbraun. Sorbinose: purpurrote Färbung, die mit Alkohol gelbbraun wird. Glukuronsäure: bläulich rötliche Färbung, die alkoholische Lösung des Absatzes ist schön blau, schwach rötlich fluoreszierend mit einem Bande nahe der D-Linie gegen Grün zu. Über Nachweis der Glukuronsäure mit dieser Reaktion, besonders bei Gegenwart von Pentosen, vgl. *Tollens* (l. c. S. 98, 99). Die Reaktion ist für Glukuronsäure wertvoll.

Anilin, $C_6H_5.NH_2$:

```
     C.NH2

HC        CH

HC        CH

     CH
```

Es wird hergestellt durch Reduktion von Nitrobenzol. Farblose Flüssigkeit, die, wahrscheinlich durch geringe Mengen schwefelhaltiger Stoffe, sich an der Luft bräunt. Reines Anilin bleibt farblos. Siedepunkt 182°, spezi-

fisches Gewicht bei 16° = 1·024. In Wasser wenig löslich. Die wässerige Lösung von freiem Anilin wird durch eine Chlorkalklösung intensiv violett gefärbt. Durch Kaliumbichromat wird die saure Lösung eines Anilinsalzes dunkelgrün oder schwarz.

Zur Prüfung auf Kohlenwasserstoffe und Nitrobenzol löst man 5 cm^3 Anilin in 10 cm^3 Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·123 auf. Es entsteht eine klare Flüssigkeit, die sich nach dem Verdünnen mit der gleichen Menge Wasser und nach dem Erkalten nicht trüben darf.

Anilin und Eisessig gibt mit Furol, das durch Destillation der Pentosen mit Salzsäure gewonnen wird, eine charakteristische Rotfärbung, die besonders zum Nachweis der Arabinose und von Xylose und Glukuronsäure angewandt wird. Rhamnose bildet mit Anilin und Eisessig gefärbte Methylfurfurolamine.

Diphenylamin, $C_6H_5 . NH . C_6H_5$:

N
H

weiße Blätter von brennendem, aromatischem Geschmack, Schmelzpunkt 54°, Siedepunkt 310°. Sehr wenig löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther und Ligroin.

0·2 *g* reinen Diphenylamins geben mit 2 cm^3 Wasser und 20 cm^3 konzentrierter reiner Schwefelsäure eine farblose Lösung.

Zur Prüfung auf Anilin wird 1 *g* Diphenylamin in 20 cm^3 Chlorkalklösung geschüttet: die Flüssigkeit darf keine violette Farbe annehmen.

Diphenylamin wird als sehr empfindliches Reagens auf Salpetersäure verwendet. Bringt man den zu untersuchenden Stoff mit einer Lösung von Diphenylamin in konzentrierter Schwefelsäure zusammen, so tritt bei Anwesenheit von Salpetersäure oder salpetriger Säure intensive Blaufärbung auf. Auch andere oxydierende Körper geben die gleiche Reaktion, auch die organischen Superoxyde. Die Blaufärbung wird meist bald mißfarbig.

Diphenylamin gibt mit einigen Kohlenhydraten Färbungen. Formose: braunviolette bis braunrote Färbung. Fruktose (für Bestimmungen im Harn geeignet): 1 cm^3 des auf das 10fache verdünnten Harns mit 8—10 Tropfen einer 20%igen alkoholischen Diphenylaminlösung und 1 cm^3 konzentrierter Salzsäure aufgekocht gibt nach weniger als 1 Minute Blaufärbung. Rohrzucker: mit alkoholischem Diphenylamin gelbgrüne, dann rote, violette, blaue Färbung.

Diazobenzolsulfosäure, $C_6H_4N_2 . SO_3$

$$C_6H_4\langle{}^{N = N}_{SO_3}\rangle$$

Sie wird gewonnen durch Eingießen eines Gemisches von sulfanilsaurem Natrium und Natriumnitrit in verdünnte Schwefelsäure.

Weiße in Wasser schwer lösliche Nadeln, die alle Reaktionen der Diazoverbindungen zeigen. Sie gibt als Alkalisalz mit Aldehyden rotviolette

Färbung, ähnlich der des Fuchsins. Diese tritt bei allen Aldehyden ein, die in alkalischen Lösungen beständig sind. Dementsprechend reagiert sie mit einer Reihe von Kohlenhydraten. Vgl. hierzu *Tollens*, d. Handbuch, Bd. 2, S. 107. Methyl-Tetrose: violette Färbung. Traubenzucker gibt die Reaktion besonders schön, während er gegen fuchsinschweflige Säure indifferent ist. Formose: braunviolette bis braunrote Färbung.

Kampfer, $C_{10}H_{16}O$

$$
\begin{array}{ccc}
 & CH & \\
H_2C & & CH_2 \\
 & H_3C \cdot C \cdot CH_3 & \\
H_2C & & CO \\
 & C & \\
 & CH_3 &
\end{array}
$$

Findet sich als Ausscheidungsprodukt des Kampferbaums wie auch in einer Anzahl anderer pflanzlicher Stoffe. Darstellung aus dem Kampferbaum, ferner synthetisch besonders aus dem Pinen über das Isoborneol. Farblose, durchscheinende, leicht sublimierende, glänzende Prismen vom Schmelzpunkt 177—178°, Siedepunkt 204°, spezifisches Gewicht 0·9853. Ist optisch aktiv (α_D = + zirka 45°) in dampfförmigem, geschmolzenem oder gelöstem Zustande, optisch inaktiv in kristallisierter Form. In Wasser sehr wenig löslich.

Kampfer gibt mit einer Reihe von Kohlenhydraten und konzentrierter Schwefelsäure Farbenreaktionen. Er soll gegenüber α-Naphthol den Vorteil haben, gegen kleine Nitritmengen unempfindlich zu sein. Traubenzucker: rosenrote Färbung. Rohrzucker: gleiche Reaktion.

Fuchsin

$$
HO.C \begin{cases} C_6H_3 \begin{smallmatrix} CH_3 \\ NH_2 \end{smallmatrix} \\ C_6H_4NH_2 \\ C_6H_4NH_2 \end{cases} HCl
$$

ist das salzsaure Salz der Rosanilinbase mit einem Äquivalent Säure:

Grüne, metallglänzende Kristalle, die sich in Wasser mit intensiv roter Farbe auflösen.

Eine durch schweflige Säure entfärbte Lösung von reinem Rosanilin wird durch Aldehyde intensiv rot bis rotviolett gefärbt (*Schiff*sche Reaktion). Das Reagens wird hergestellt durch Einleiten von Schwefligsäureanhydrid in eine 0·025%ige Lösung eines Rosanilinsalzes, bis die Flüssigkeit nur noch schwach gelb gefärbt ist. Das Reagens ist um so empfindlicher, je geringer der Überschuß an schwefliger Säure ist. Es läßt sich in verschlossenen Flaschen lange unverändert aufbewahren.

Verwendbar z. B. zum Nachweis von Glycerinaldehyd. Traubenzucker gibt die Reaktion nur unter gewissen Kautelen.

Alkaloide:

Kodein, $C_{18}H_{21}NO_3$, kommt im Opium vor, aus dem es auch gewonnen wird. Es ist der Methyläther des Methylmorphins. Kleine wasserfreie Kristalle oder 1 Molekül Wasser enthaltend, bei 155° bzw. 153° schmelzend. Linksdrehend. Leicht löslich in Wasser, Alkohol und Äther. Mit Eisenchlorid entsteht im Gegensatz zum Morphin keine Blaufärbung.

Geeignet zum Nachweis von Dioxyaceton und dem in dieses durch Erhitzen mit Bromwasser übergeführten Glycerin. 0·1 *cm*³ einer 0·5%igen Kodeinlösung mit 0·4 *cm*³ der zu untersuchenden Flüssigkeit und 2 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure geben nach Erhitzen im siedenden Wasserbad eine grünlich-blaue Färbung, mit kräftigem Absorptionsband im Rot. Rohrzucker: 6—8 Teile + 1 Teil Kodein + einige Tropfen Schwefelsäure gibt purpurrote Färbung, die über Violett braun wird.

Veratrin, $C_{32}H_{49}NO_9$, aus den Sabadillsamen hergestelltes, nicht genau definiertes Alkaloid, das in reinem Zustand aus Alkohol in rhombischen Prismen kristallisiert, die man durch vorsichtiges Trocknen alkoholfrei bekommt. Die Verbindung schmilzt bei 205°. Unlöslich in Wasser, leicht löslich in Äther und heißem Alkohol. Reagens auf Fruktose: beim Versetzen von 6 Teilen Fruktose mit 1 Teil Veratrin und einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure färbt sich die Flüssigkeit gelb; die Farbe wird allmählich über Grün violett. Die gleiche Reaktion gilt für den Rohrzucker.

Morphin, $C_{17}H_{19}NO_3$. Wird aus dem Opium dargestellt. Aus Alkohol seidenglänzende Nadeln oder rhombische Prismen, die ihr Molekül Kristallwasser bei 128° verlieren und unter Zersetzung gegen 230° schmelzen. Morphin ist linksdrehend. Sehr schwer löslich in kaltem, leichter in heißem Wasser. Anwendung finden meist die Salze, hauptsächlich das Hydrochlorid, $C_{17}H_{19}NO_3 . HCl + 3H_2O$, seidenartige Fasern vom Schmelzpunkt 200°, löslich in Wasser, sehr wenig in Alkohol, unlöslich in Äther. Eisenchlorid erzeugt in einer Lösung von Morphin eine blaue Färbung, die beim Erwärmen oder Zusatz von Säuren verschwindet. Es gibt mit Kohlenhydraten Farbenreaktionen, die wahrscheinlich auf Furolbildung beruhen. Rohrzucker: 6—8 Teile + 1 Teil Morphin + einige Tropfen konzentrierte Schwefelsäure gibt purpurrote, weinrote oder violettrote Färbung, die allmählich in Violett, Blaugrün und Gelb übergeht.

Narkotin, $C_{22}H_{23}NO_7$, wird aus Opium gewonnen. Kristallisiert aus Alkohol in langen platten Nadeln, die bei 176° schmelzen. Unlöslich in Wasser, ziemlich schwer löslich in Äther, leichter in Benzol (Gegensatz zum Morphin), leicht löslich in Chloroform, Aceton, Schwefelkohlenstoff. Es dreht in neutraler Lösung nach links, in saurer Lösung nach rechts.

Gibt Farbenreaktionen mit Kohlenhydraten, die auf Furolbildung zurückzuführen sind. Rohrzucker: 6—8 Teile + 1 Teil Narkotin + einige

Tropfen konzentrierter Schwefelsäure geben eine grünlichgelbe Färbung, welche braungelb, braunviolett und blauviolett wird.

Aconitin, $C_{34}H_{47}NO_{11}$. Alkaloid, das aus dem Sturmhut gewonnen wird. Rhombische Prismen oder Tafeln aus Alkohol, Drusen aus Chloroform, die beim raschen Erhitzen bei 197—198° schmelzen. Dreht nach rechts. Die Salze drehen in wässeriger Lösung nach links. Fast unlöslich in Wasser, schwer löslich in absolutem Alkohol und Benzol, leichter löslich in Äther. Äußerst giftig (Gegenmittel: Atropin). Gibt auf Furolbildung zurückzuführende Reaktion mit Kohlenhydraten. Rohrzucker, 6—8 Teile mit einem Teil Aconitin und einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure geben orangegelbe, nach anderen Angaben rosarote Färbung, die über Violett braun wird.

3. Reagentien zur Bestimmung der Eiweißkörper und ihrer Abbauprodukte.

β-Naphthalinsulfochlorid, $C_{10}H_7(SO_2Cl)$:

```
         H    H
         C    C
            C
   HC            C.SO2Cl

   HC            CH
            C
         C    C
         H    H
```

Es wird dargestellt aus einem Molekül naphthalinsulfosaurem Natrium mit 1½ Molekül Phosphorpentachlorid. Das im Handel erhältliche ist zum Teil nicht ganz rein: es wird zweckmäßig durch Destillation bei 0·3 *mm* gereinigt und stellt dann, nach Umkristallisieren aus Benzol, Kristalle dar, die bei 78° (korr. 79°) schmelzen, 2° höher als sonst in der Literatur angegeben.

β-Naphthalinsulfochlorid dient zur Identifizierung von Aminosäuren und Polypeptiden. Über die Anstellung der Reaktion vgl. *Abderhalden*, d. Handbuch, Bd. 2, S. 495 und 531. Naphthalinsulfochlorid gibt im Gegensatz zu Benzolsulfochlorid auch mit den Oxyaminosäuren und Polypeptiden gut charakterisierte Derivate. (*Fischer* und *Bergell*, Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. **35**, S. 3779.)

β-Naphthalinsulfoglycin, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.COOH$, aus der alkalischen Lösung beim Ansäuern in der Kälte sofort als kristallinischer Niederschlag ausfallend. Aus heißem Wasser langgestreckte, meist büschelförmig verwachsene Blätter ohne Kristallwasser, die bei 151° sintern und bei 156° (korr. 159°) schmelzen. Sehr schwer löslich in kaltem, mäßig löslich in kochendem Wasser, leicht löslich in Alkohol.

β-Naphthalinsulfo-d,l-alanin, $C_{10}H_7SO_2 . NH . CH(CH_3) . COOH$, farbloses, bald kristallinisch erstarrendes Öl. Feine zu Aggregaten verwachsene Nadeln. Schmelzpunkt 150—151° (korr. 152—153°). Schwer löslich in kaltem, leichter in siedendem Wasser.

β-Naphthalinsulfo-d-alanin, feine, meist büschelförmig verwachsene Nädelchen, die bei 62° sintern und bei 78—80° (79—81° korr.) schmelzen. Beim Trocknen verliert die Substanz Kristallwasser: sie sintert dann von 117° ab und schmilzt bei 122—123°.

β-Naphthalinsulfo-dl-leucin, $C_{10}H_7 . SO_2 . NH . CH(C_4H_9) . COOH$, aus heißem verdünnten Alkohol farblose, glänzende Blättchen, die bei 145—146° (korr.) schmelzen. Schwer löslich in heißem Wasser, sehr leicht löslich in Alkohol und Äther.

β-Naphthalinsulfo-l-leucin, aus 20%igem Alkohol lange, dünne, spießartige Prismen, die bei 60° sintern und bei 67° (korr. 68°) zu einem farblosen Öl schmelzen. Sehr schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol und Äther.

β-Naphthalinsulfo-phenylalanin, $C_{10}H_7 . SO_2 . NH . CH (COOH) . CH_2 . C_6H_5$. Kristallisiert erst nach längerem Stehen. Aus heißem, sehr verdünntem Alkohol weiße, asbestartige, aus feinen Nadeln bestehende Masse, aus Wasser feine Nädelchen, die sich zu kugelförmigen Aggregaten zusammenlagern. Kristallwasserfrei. Schmelzpunkt 141—142° (143—144° korr.). Es ist auch in kochendem Wasser schwer löslich, leicht löslich dagegen in Alkohol und Äther.

Aktive β-Naphthalinsulfo-α-pyrrolidinkarbonsäure, $C_{10}H_7 . SO_2 . N \begin{cases} CH_2 \text{———} CH_2 \\ \quad\quad\quad\quad\quad | \\ CH(COOH) . CH_2 \end{cases}$. Fällt aus der alkalischen Lösung als schnell festwerdendes Öl aus. Kristallisiert aus heißem, verdünntem Alkohol und aus Wasser in dünnen, oft zentimeterlangen Blättchen mit 1 Molekül Kristallwasser. Sie sintert bei 80° und schmilzt bei 133·7° (korr.); wird die Substanz vorher bei 90° getrocknet, so schmilzt sie scharf bei 138° (korr.). Schwer löslich in kaltem Wasser, löslich in 130 Teilen kochenden Wassers, leicht löslich in Alkohol.

β-Naphthalinsulfooxy-α-pyrrolidinkarbonsäure, $C_{15}H_{15}O_5N . S + H_2O$. Aus Wasser dünne, manchmal langgestreckte Blättchen, die bei 86° sintern und bei 91—92° (korr.) zu einem hellbraunen Öl schmelzen. Schwer löslich in kaltem, leicht löslich in kochendem Wasser, ziemlich leicht löslich in Äther, leicht löslich in Alkohol. Die Verbindung enthält 1 Molekül Kristallwasser.

β-Naphthalinsulfo-serin, $C_{10}H_7 . SO_2 . NH . CH (CH_2 . OH) . COOH$, wird zunächst amorph erhalten, nach wiederholtem Umkristallisieren wird es kristallisiert gewonnen, und zwar hauptsächlich kristallwasserfrei beim raschen Abkühlen einer konzentrierten Lösung, am besten aus heißem Alkohol. Schmelzpunkt 214° (korr.). Löslich in ungefähr 70—80 Teilen kochenden Wassers, leicht löslich in Alkohol, ziemlich schwer löslich in

Äther. Ferner existiert eine kristallwasserhaltige Verbindung mit wahrscheinlich 3 Molekülen Kristallwasser.

Di-β-Naphthalinsulfotyrosin. $C_{10}H_7.SO_2.O.C_6H_4.CH_2.CH(COOH).NH.SO_2.C_{10}H_7$. Entsteht als weißer flockiger Niederschlag beim Schütteln einer alkalischen Lösung von Tyrosin und einer ätherischen Lösung von β-Naphthalinsulfochlorid im Überschuß in weißen Flocken als Natriumsalz. Dieses kristallisiert in Nadeln, die bei 250° sintern und bei 252—254° unter Schäumen schmelzen. Ziemlich leicht löslich in heißem Wasser und heißem Methylalkohol, schwer löslich in denselben in der Kälte, sehr schwer löslich in Alkohol, unlöslich in Äther und Benzol. Die Verbindung gibt die *Millon*sche Reaktion nicht. Die durch Spaltung mit Salzsäure gewonnene freie Säure bildet Nadeln oder Blättchen, die bei 100—102° zu einem zähen Öl schmelzen, welches erst über 120° flüssig wird. Bariumsalz: auch in heißem Wasser schwer löslich.

β-Naphthalinsulfo-d-arginin. $C_6H_{13}N_4O_2.SO_2.C_{10}H_7$. Bildet ein weißes, leichtes Pulver, das bei 87—89° farblos schmilzt.

β-Naphthalinsulfo-d-ornithin, $C_5H_{11}N_2O_2.SO_2.C_{10}H_7$, wird als körniger, weißer Niederschlag erhalten, der bei 189° schmilzt.

β-Naphthylinsulfo-l-tryptophannatrium. $C_{21}H_{17}N_2O_4SNa$. Mikroskopische Nadeln vom Schmelzpunkt 304°.

β-Naphthalinsulfo-galaheptosaminsäure. $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH(COOH).(CH.OH)_4.CH_2.OH$. Schmelzpunkt gegen 201° (korr.) unter Zersetzung, leicht löslich in heißem, schwer löslich in kaltem Wasser, schwer löslich in Alkohol und Äther.

β-Naphthalinsulfo-glycyl-glycin, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$, ölige Fällung, die beim Abkühlen auf 0° in einen Kristallbrei verwandelt wird, der aus heißem Wasser oder Alkohol umkristallisiert wird. Die Substanz enthält 1 Molekül Wasser, das bei 100° entweicht. Das getrocknete Produkt schmilzt bei 180—182° (korr.). Löslich in 15.045 Teilen Wasser von 20°, in 45 Teilen Wasser von 100°, leicht löslich in kochendem Alkohol. Beim Kochen der wässerigen Lösung mit Kupferoxyd gibt der Körper leicht ein Kupfersalz, das schwer löslich ist und sich beim Erkalten als hellblaue, mikrokristallinische Masse — sehr kleine Nadeln oder Prismen — abscheidet; sehr dünne rhombische Tafeln und Blättchen. Silbersalz: schwer löslich in kaltem Wasser. Bariumsalz: Nadeln, die in heißem Wasser schwer löslich sind. Magnesiumsalz: sehr feine, sternförmig zusammenliegende Nadeln, leichter löslich. Bleisalz: dünne glitzernde Blättchen, in kaltem und auch in heißem Wasser sehr schwer löslich. Calciumsalz: sehr dünne zugespitzte Blätter, in heißem Wasser etwas leichter löslich als das Bariumsalz.

β-Naphthalinsulfoglycyl-d-alanin $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(CH_3).COOH$. Fällt zunächst bei der Reaktion als Öl aus, das schnell kristallinisch erstarrt; bei wiederholtem Umkristallisieren werden große, glänzende Blättchen erhalten, die bei 154—155° (korr.) schmelzen. Unter Umständen wird eine kristallwasserhaltige Verbindung erhalten, die bei

derselben Temperatur schmilzt, jedoch etwas unter 100° sintert. Die Säure dreht in alkalischer Lösung + 7·11° nach rechts. Sehr schwer löslich in Äther und kaltem Wasser, ziemlich löslich in kochendem Wasser, leicht löslich in Alkohol. Die amorphe Silber- und Bleiverbindung ist schwer löslich, nicht dagegen das Calcium- oder Bariumsalz im Gegensatz zu den Salzen des isomeren β-Naphthalinsulfo-d-Alanylglycins.

β-Naphthalinsulfo-d-alanyl-glycin. $C_{10}H_7 . SO_2 . NH(CH_3)CO . NH . CH_2 . COOH$. Nach wiederholtem Umkristallisieren Blättchen von seidigem Glanz, ohne Kristallwasser, die ganz rein scharf bei 180·5—181·5° (korr.) schmelzen. Die Säure zeigt in alkalischer Lösung eine spezifische Drehung von 63·71°. Schwer löslich in kaltem Wasser, ziemlich löslich in kochendem Wasser, leicht löslich in Alkohol, schwer löslich in Äther. Äthylester: lange, büschelförmig aneinander liegende Nadeln, die bei 104° (korr.) schmelzen. Das Silber- und Bleisalz ist in kaltem Wasser schwer löslich, das Calcium- und Bariumsalz etwas leichter, jedoch besser kristallisierend.

Ein Trennungsverfahren für β-Naphthalinsulfoglycyl-d-alanin und β-Naphthalinsulfo-d-alanylglycin beruht auf der geringen Löslichkeit der Calcium- und Bariumsalze der letzteren Verbindung.

β-Naphthalinsulfoglycyl-tyrosin, $C_{10}H_7 . SO_2 . NH . CH_2 . CO . NH . CH(COOH) . CH_2 . C_6H_4 . OH$. Winzige, verfilzte Nädelchen, die bei 153° sintern, bei 161° (korr.) schmelzen. Beim Umkristallisieren aus sehr verdünntem Alkohol beiderseitig zugespitzte Nadeln ohne Kristallwasser, die bei 157—158° sintern und bei 166—166·5° (korr.) schmelzen.

Sehr schwer löslich auch in heißem Wasser, schwer löslich in Äther und Chloroform, leicht löslich in Aceton und in Alkohol, besonders in der Wärme. Löslich in Ammoniak und verdünnten Alkalien; in diesen Lösungen dreht es etwas nach rechts. Durch Ansäuren wird die Verbindung gefällt. Sie wird durch Pankreatin leicht gespalten.

β-Naphthalinsulfoglycyl-dl-leucin, $C_{10}H_7 . SO_2 . NH . CH_2 . CO . NH . CH(COOH) . CH_2 . CH(CH_3)_2$. Fällt bei der Reaktion zunächst ölig aus, um bei längerem Stehen bei 0° zu kristallisieren. Aus heißem 20%igen Alkohol ziemlich lange, zu Sternen gruppierte Nadeln oder Blätter ohne Kristallwasser. Sintert bei 120° und schmilzt ziemlich scharf bei 124·3° bis 125°. Die Verbindung ist auch in heißem Wasser ziemlich schwer löslich, ebenfalls ziemlich schwer löslich in Äther, leicht löslich in Alkohol und Essigäther. Bildet ein schwer lösliches Bariumsalz.

Di-β-Naphthalinsulfotyrosyl-dl-leucin, $C_{10}H_7 . SO_2 . O . C_6H_4 . CH_2 . CH(NH . SO_2 . C_{10}H_7)CO . NH . CH . (COOH) . CH_2 . CH(CH_3)_2$. Kleine, zu Sternen gruppierte Nädelchen ohne scharfen Schmelzpunkt, die bei 90° sintern und unscharf von 100—105° schmelzen. Auch in heißem Wasser ist die Verbindung schwer löslich, ebenso in Äther, dagegen leicht löslich in kaltem Alkohol, Essigäther, Aceton und Chloroform. Pankreatin in alkalischer Lösung zersetzt die Verbindung nicht.

β-Naphthalinsulfo-d,l-leucylglycin. Schmelzpunkt 104—105°; es liefert ein leicht lösliches Bariumsalz.

β-Naphthalinsulfoglycyl-l-leucin, $C_{10}H_7.SO_2.NH.CH_2.CO.NH.CH(COOH).CH_2.CH(CH_3)_2$. Aus 60%igem Alkohol lange, rechteckige Tafeln, die bei 144—145° schmelzen. Spezifische Drehung ungefähr + 15°.

Phenylisocyanat, $C_6H_5.N:C:O$:

CH

HC C — N = C = O

HC CH

CH

wird gewonnen aus Phenylurethan durch Destillation mit Phosphorpentachlorid. Farblose, die Augenbindehaut stark reizende Flüssigkeit vom Siedepunkt 166°. Es bildet mit primären und sekundären Aminen wie mit Aminosäuren, auch mit Aminozuckern und Peptonen charakteristische Verbindungen. Über die Methode des Nachweises von Aminosäuren mit Phenylisocyanat vgl. *Abderhalden*, dieses Handbuch, Bd. 2, S. 496. Sehr charakteristisch ist u. a. die Leucinverbindung.

Glukosamin-phenylisocyanatverbindung:

$$CH_2OH(CHOH)_3.CH\begin{matrix} COH \\ NH.CO.NH.C_6H_5 \end{matrix}.$$

Es entsteht, wenn man eine gut gekühlte Lösung von 2·25 *g* Glukosaminchlorhydrat in 30 *cm*³ Wasser und 10 *cm*³ n-Kalilauge tropfenweise unter stetem Schütteln mit 1·19 *g* Phenylisocyanat versetzt, als amorphes Produkt. Bei 1stündigem Erwärmen mit 20%iger Essigsäure im Wasserbad geht es fast quantitativ in sein Anhydrid, α-Tetraoxybutyl-ν-Phenyl-μ-Hydroxyimidazol:

C = CH

$CH_2OH.(CHOH)_3.N:C.N.C_6H_5$

OH

weiße rhombische Kristalle, die sich bei 200° bräunen und bei 210° schmelzen, wenig löslich in Wasser und Alkohol. $\alpha_D = + 76·9°$. Infolge seiner Unlöslichkeit in alkalischen Flüssigkeiten ist eine Trennung von gleichzeitig anwesenden Aminosäuren ermöglicht.

Phenylisocyanat-α-aminoisovaleriansäure, $(CH_3)_2CH.CH(NH.CO.NH.C_6H_5).COOH$. Durch Lösen der Aminosäure mit einem Mol.-Gewicht Kalilauge in 30 Teilen Wasser und Zufügen von ⁵/₄ Mol Phenylisocyanat unter heftigem Rühren bei 0°. Beim Ansäuern des Filtrates als zähe harzige Masse ausfallend, die später kristallinisch erstarrt. Aus heißem Wasser umkristallisiert, farblose Blättchen, die bei 163·5° (korr.) unter Zersetzung schmelzen. Leicht löslich in Alkalien und Alkalikarbonaten, ziemlich leicht löslich in heißem Alkohol, schwer löslich in Äther.

Phenylisocyanat-α-amino-n-valeriansäure, $CH_3.(CH_2)_2.CH.(NH.CO.NH.C_6H_5).COOH$. Wird erst über das Hydantoin kristallinisch gewonnen. Aus heißem Wasser farblose Blättchen, die bei 119° (korr.) unter Zersetzung schmelzen. Fast unlöslich in Ligroin, schwer löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Äther, Aceton, Chloroform.

Phenylisocyanat-α-aminomethyläthylessigsäure. Schmelzpunkt 179—180° (korr.).

Phenylisocyanat-β-aminoisovaleriansäure, $(CH_3)_2C(NH.CO.NH.C_6H_5).CH_2.COOH$. Aus Wasser Nadeln vom Schmelzpunkt 137° (korr.). Sehr schwer löslich in kaltem, ziemlich leicht in kochendem Wasser, leicht löslich in Alkohol und starker Salzsäure, sehr schwer löslich in Äther. Durch Kochen mit Salzsäure entsteht das Anhydrid, das 1-Phenyl-4-Dimethylhydrouracil, $OC\begin{matrix} \diagup N(C_6H_5)-CO \diagdown \\ \diagdown NH - C(CH_3)_2 \diagup \end{matrix}CH_2$, aus heißem Alkohol lange farblose Nadeln, leicht löslich in heißem Alkohol, sehr schwer löslich in Wasser und Äther. Schmelzpunkt 237°.

Phenylisocyanat-d-phenylalanin, $C_6H_5.CH_2.CH.COOH$
$NH.CO.NH.C_6H_5$, aus Wasser farblose Nadeln, die bei 180—181° (korr.) schmelzen, fast unlöslich in kaltem Wasser, Äther und Ligroin, leicht löslich in heißem Alkohol. In alkalischer Lösung $\alpha_D 20 = + 61{\cdot}27°$.

Phenylisocyanat-l-phenylalanin, $C_6H_5.CH_2.CH.COOH NH.CO.NH.C_6H_5$, aus heißem Wasser farblose Nadeln, die gegen 200° schmelzen. Fast unlöslich in kaltem Wasser und Äther, leicht löslich in heißem Alkohol. $\alpha_D 20$ in alkalischer Lösung $= - 61{\cdot}25°$.

Phenylisocyanat-dl-leucin, $(CH_3)_2CH.CH_2.CH.COOH$
$NH.CO.NH.C_6H_5$, fällt aus warmem Alkohol durch Zusatz von heißem Wasser bis zur Trübung in farblosen Nadeln, die bei 165° (korr.) unter Gasentwicklung schmelzen. Aus Alkohol flache Prismen oder glänzende Blättchen. Ziemlich schwer löslich in kochendem Wasser, sehr leicht in siedendem Alkohol, Aceton und Essigester, schwerer in Äther, Chloroform und Benzol. Sehr geeignet zur Erkennung des Leucins.

Phenylisocyanat-d-isoleucin, $C_{13}H_{18}N_2O_3$, weiße, glänzende Blättchen, die bei 119—120° schmelzen. Unlöslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser, Chloroform, Alkohol, Äther, Aceton, Essigester. Optische Drehung: in alkalischer Lösung ist $\alpha_D 20 = + 14{\cdot}92°$.

Phenylisocyanat-oxyprolin, $C_{12}H_{14}O_4N_2$. Feine, meist zu Büscheln verwachsene Blättchen, die sich gegen 175° zersetzen.

Phenylisocyanat-serin, $CH_2(OH).CH.COOH NH.CO.NH.C_6H_5$, aus Wasser feine, meist sternförmig vereinigte Nadeln, die bei 168—169° (korr.) schmelzen. Leicht löslich auch in kaltem Wasser, noch leichter in Alkohol.

Phenylisocyanat-isoserin. $C_6H_5.NH.CO.NH.CH_2.CH(OH).COOH$. Lange Tafeln, die bei 183—184° (korr.) unter Gasentwicklung schmelzen. Leicht löslich in Alkohol, fast unlöslich in Äther. Leicht löslich in heißem, schwerer in kaltem Wasser. Die Verbindung wird im Gegensatz zu den Phenylisocyanatderivaten der gewöhnlichen α-Aminosäuren durch Kochen und Abdampfen mit 25%iger Salzsäure nicht in das Anhydrid übergeführt.

Phenylisocyanat-l-pyrrolidinkarbonsäure. Zu ihrer Darstellung werden 1·8 *g* l-Pyrrolidinkarbonsäure in 15 *cm*³ Normalnatronlauge gelöst und nach guter Abkühlung 2 *g* Phenylisocyanat in kleinen Portionen unter kräftigem Schütteln zugefügt. Nach Entfernen und Filtrieren des Reaktionsproduktes wird angesäuert, wobei die Isocyanatverbindung als harzige Masse ausfällt. Durch Zufügen von soviel Salzsäure, daß die Lösung etwa 4% davon enthält, und Einengen auf dem Wasserbade bilden sich die Kristalle des

Anhydrids, die aus kochendem Wasser umkristallisiert werden. Hieraus flache Nadeln, die bei 144° (korr.) schmelzen, leicht löslich in Alkohol und Aceton, mäßig leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Äther. Die Verbindung (Strukturformel s. bei der Verbindung des Racemkörpers) ist zur Erkennung der aktiven Pyrrolidinkarbonsäure gut geeignet.

Phenylcyanat-dl-pyrrolidinkarbonsäure.

$$\begin{array}{l} CH_2.CH_2 \\ CH_2.CH.COOH \\ \quad \diagdown \\ \quad\; N.CO.NH.C_6H_5 \end{array}$$

ziemlich schwer löslich in heißem Wasser, leicht löslich in Aceton und Alkohol. Schmelzpunkt gegen 170° unter Aufschäumen. Sie geht beim Erhitzen mit starker Salzsäure in das Anhydrid:

$$\begin{array}{l} CH_2 - CH_2 \\ \;|\qquad\quad | \\ CH_2 \quad CH.CO \\ \quad \diagdown \qquad\; | \\ \qquad N \quad CO.N.C_6H_5 \end{array}$$

über, aus heißem Alkohol feine farblose Prismen, die bei 118° (korr.) schmelzen. Ziemlich leicht löslich in heißem Wasser, warmem Alkohol, schwerer löslich in Äther.

Phenylisocyanat-dl-lysin, farblose Nadeln, die bei 182° (korr.) sintern und bei 185° (korr.) schmelzen. Fast unlöslich in Wasser, ebenso in starker heißer Schwefelsäure.

Phenylisocyanat-d-lysin. Schmelzpunkt 183—184° (korr.) (*Herzog*, Zeitschr. f. phys. Chem., Bd. **34**, S. 525).

Phenylisocyanat-α-amino-γ-oxyvaleriansäure (Lakton). Schmelzpunkt 165—166° (korr.).

Phenylisocyanat-glycylglycin. $C_6H_5.NH.CO.NH.CH_2.CO.NH.CH_2.COOH$. Aus Glycylglycinester in Normallauge mit Phenylisocyanat entsteht das Natriumsalz, aus dem durch Ansäuern mit verdünnter Essigsäure das Phenylcyanatglycylglycin gewonnen wird. Feine seidenglänzende Nadeln, bei 175° (korr.) unter Zersetzung schmelzend. Ziemlich leicht löslich in heißem Alkohol, sehr schwer löslich in Äther. Die alkalische Lösung gibt nicht Biuretreaktion.

Phenylisocyanat-α-leucylphenylalanin. $C_6H_5.NH.CO.NH.CH(C_4H_9)CO.NH.CH<^{COOH}_{CH_2.C_6H_5}$. Durch Umlösen in Essigester und Zugabe des doppelten Volumens Petroläther werden sechsseitige, anscheinend rhombische Tafeln gewonnen, welche bei 193—195° (korr.) unter Zersetzung schmelzen. Sehr schwer löslich in Wasser, fast unlöslich in Petroläther, mäßig löslich in Benzol und Chloroform, leicht löslich in Alkohol, Äther, Essigester und Aceton.

Phenylisocyanat-β-leucylphenylalanin. Wird auf gleiche Weise wie die isomere Form analysenrein erhalten. Mikroskopisch kleine Nadeln, die konstant bei 183—184° (korr.) schmelzen. Die Lösungsverhältnisse sind die gleichen wie bei der α-Verbindung.

Phenylisocyanat-alanyl-leucin A. $C_6H_5.NH.CO.NH.CH(CH_3).CO.NH.CH.(C_4H_9)COOH$. Wird gewonnen durch Lösen des Dipeptids in etwas mehr als der für 1 Molekül berechneten Menge n-Natronlauge und tropfenweisen Zusatz der berechneten Menge Phenylisocyanat zu der auf 0° abgekühlten und kräftig geschüttelten Flüssigkeit. Die alkalische abfiltrierte Flüssigkeit wird mit verdünnter Salzsäure übersättigt; die anfangs klebrige Verbindung erstarrt bald kristallinisch und wird aus heißem Äthylacetat umkristallisert. Aus heißem Wasser mikroskopische vierseitige Plättchen, die unter Zersetzung bei 214—218° (korr.) schmelzen, leicht löslich in Alkohol, schwer löslich in Wasser, sehr schwer in Äther und Benzol.

Phenylisocyanat-alanyl-leucin B wird auf die gleiche Weise wie das Isomere dargestellt. Aus heißem Wasser mikroskopische, zu Büscheln vereinigte Nadeln, die bei 185—189° (korr.) schmelzen.

Phenylisocyanat-leucyl-isoserin A. $C_4H_9.CH.CO.NH.CH_2.CH(OH).COOH.NH.CO.NH.C_6H_5$. Die in üblicher Weise gewonnene Substanz wird in Essigäther gelöst und mit Petroläther gefällt oder aus heißem Wasser umkristallisiert. Bei langsamem Kristallisieren bilden sich gewöhnlich kleine Prismen, die bei 176—177° (korr.) schmelzen. Die Verbindung ist in Alkohol, Aceton, Essigäther leicht löslich, in Petroläther dagegen fast gar nicht löslich.

Phenylisocyanat-leucyl-isoserin B, auf die gleiche Weise hergestellt wie das Isomere, fällt aus heißem Wasser in vierseitigen Prismen aus, die an einem Ende abgestumpft sind. Schmelzpunkt 192—193° (korr.).

α-Naphthylisocyanat, $C_{10}H_7N=CO$

```
        H    H
        C    C
          C
HC              C.N=C=O

HC              CH
          C
        C    C
        H    H
```

Darstellung aus α-Naphthylurethan mit einem erheblichen Überschuß von Phosphorsäureanhydrid.

Es bildet eine Flüssigkeit vom Schmelzpunkt 270°. Im Gegensatz zum Phenylisocyanat entwickelt es keine stechenden, giftigen Dämpfe. Es ist gegen Wasser ziemlich beständig und kann ohne Kühlung mit der alkalischen Lösung der Aminosäure zusammengebracht werden. Der Überschuß verwandelt sich in den ganz unlöslichen Dinaphthylharnstoff; von diesem wird abfiltriert und das Filtrat angesäuert. Durch Erhitzen mit Barytwasser können die Aminosäuren aus der Isocyanatverbindung regeneriert werden.

α-Naphthylisocyanat-glycin, $COOH.CH_2.NH.CO.NH.C_{10}H_7$. Feine farblose Nädelchen ohne Kristallwasser, die bei 190·5—191·5° schmelzen. Die Verbindung ist außer in Alkalien auch in Ammoniak löslich. Durch Zusatz von Bariumchlorid oder Barytwasser zu der ammoniakalischen Lösung fällt das sehr schwer lösliche Bariumsalz aus, das zur Trennung des Glykokolls von den anderen Aminosäuren benutzt werden kann.

α-Naphthylisocyanat-dl-alanin, $COOH.CH(CH_3).NH.CO.HN.C_{10}H_7$. Kleine Nädelchen vom Schmelzpunkt 198°. Das Bariumsalz ist ziemlich leicht löslich.

α-Naphthylisocyanat-n-dl-aminobuttersäure, $COOH.CH(CH_2.CH_3).NH.CO.NH.C_{10}H_7$. Scheidet sich aus verdünntem Alkohol in langen, spießigen Kristallen vom Schmelzpunkt 194—195° ab.

α-Naphthylisocyanat-leucin, $COOH.CH(C_4H_9).NH.CO.NH.C_{10}H_7$. Sehr schwer lösliche, lange, spießige Kristalle vom Schmelzpunkt 163·5°. Besonders gut zum Nachweis des Leucins geeignet.

α-Naphthylisocyanat-l-tyrosin, $COOH.CH(CH_2.C_6H_4.OH).NH.CO.NH.C_{10}H_7$. Feine, sternförmig gruppierte Nadeln, die bei 205—206° schmelzen.

α-Naphthylisocyanat-glutaminsäure, $COOH.(CH_2)_2.CH(COOH).NH.CO.NH.C_{10}H_7$. Aus 90%igem Alkohol lange verfilzte Nädelchen vom Schmelzpunkt 236—237°.

α-Naphthylisocyanat-cystin:

$$\left(\begin{array}{l} COOH.CH.NH.CH_2.S \\ \qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad CO.NH.C_{10}H_7 \end{array}\right)_2.$$

Voluminöse, über Phosphorsäureanhydrid zusammenschrumpfende Masse.

α-Naphthylisocyanat-glycylglycin, $COOH.CH_2.NH.CO.CH_2.NH.CO.NH.C_{10}H_7$. Durch Lösen in verdünntem Ammoniak und Ausfällen durch Schwefelsäure unter starkem Rühren gereinigt, bildet die Verbindung feine Nädelchen vom Schmelzpunkt 217°. Sie liefert ein Bariumsalz, das erheblich leichter löslich als das des Glykokolls ist, wodurch eine Trennung des Glykokolls und des Glycylglycins ermöglicht ist.

Benzoylchlorid, $C_6H_5.COCl$:

```
          H
          C
    HC        C.CO.Cl

    HC       CH
          CH
```

Entsteht durch Einwirkung von Phosphorpentachlorid oder Phosphoroxychlorid auf Benzoesäure oder durch Chlorierung aus Benzaldehyd. Unangenehm riechende Flüssigkeit vom Siedepunkt 194°, die gegen Wasser ziemlich beständig ist. Benzoylchlorid dient vor allem zur Einführung der Benzoylgruppe in eine Verbindung mit Hilfe der von *Schotten* und *Baumann* angegebenen Reaktion. Hierzu wird die zu benzoylierende Substanz mit Alkali, bei Bestimmung von Aminosäuren mit Natriumbikarbonat geschüttelt. Über die Methode vgl. *Abderhalden*, dieses Handbuch, Bd. **2**, S. 496.

l-Benzoylalanin, aus Wasser schöne glänzende Platten, die bei 150—151° (korr.) schmelzen. Es ist in Wasser mäßig löslich. Die spezifische Drehung der Verbindung in wässerig-alkalischer Lösung ist $[\alpha]_D^{20^0} = -37.4^0$.

d-Benzoylalanin. Schmelzpunkt 150—151° (korr.). In wässerig-alkalischer Lösung ist die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20^0} = +37.13^0$.

dl-Benzoylasparaginsäure, glänzende, farblose Platten aus Wasser, die in lufttrockenem Zustand 1 Molekül Kristallwasser enthalten. Dieses entweicht bei 2stündigem Erhitzen auf 110°, das trockene Produkt schmilzt bei 164—165° (korr.) ohne Zersetzung. In kaltem Wasser ist die trockene Säure erheblich leichter löslich als die kristallwasserhaltige.

dl-Benzoylglutaminsäure. Aus Wasser farblose lange Blättchen, die nach Trocknen an der Luft 1 Molekül Kristallwasser enthalten, das bei 80° im Vakuum in 2 Stunden entweicht. Die getrocknete Säure schmilzt bei 155—157° (korr.). Die Alkali- und Erdalkalisalze sind auch in kaltem Wasser leicht, das Silbersalz dagegen schwer löslich.

Benzoyl-l-glutaminsäure. Aus Wasser meist dreieckig geformte Blättchen oder kompakte Aggregate ohne scharfe Umgrenzung, die bei 130—132° (korr.) schmelzen. Die Verbindung ist im Gegensatz zu der des Racemkörpers in Wasser leicht löslich. Drehung: in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = +13.8^0$, in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = -18.7^0$.

Benzoyl-d-glutaminsäure. Wurde ganz rein nicht dargestellt; die gewonnenen Präparate enthielten stets Racemkörper.

Benzoyl-dl-tyrosin. Aus Wasser weiße, zu Kugeln vereinigte Nädelchen, die bei 195—197° (korr.) schmelzen.

Benzoyl-l-tyrosin. Schmelzpunkt 165—166° (korr.). Die Verbindung ist in heißem Wasser erheblich leichter löslich als der Racemkörper. Optisches Verhalten: in 8%iger alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = +19.25^0$, in 5%iger alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^0} = +18.29^0$.

Benzoyl-d-tyrosin. Schmelzpunkt 165·5° (korr.). Optisches Verhalten: in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^\circ} = -19{\cdot}59^\circ$.

dl-Benzoylleucin wird erhalten durch Benzoylierung mit einem großen Überschuß von Benzoylchlorid in Gegenwart von Natriumbikarbonat. Schmelzpunkt 137—141° (korr.). Sehr schwer löslich in kaltem, mäßig löslich in kochendem Wasser, aus dem es sich beim Abkühlen zunächst in Form von Öltröpfchen ausscheidet, die nach einiger Zeit zu feinen Nadeln oder Blättchen erstarren. Leicht löslich schon in kaltem Alkohol, auch in Äther, Aceton und Chloroform, aus denen es in Blättchen kristallisiert. Das Kupfer- und Bleisalz ist in Wasser sehr schwer löslich.

Benzoyl-d-leucin. Aus siedendem Wasser beim Erkalten als Öl ausfallend, das bald zu kurzen, dicken Prismen erstarrt. Schmelzpunkt 105—107° (korr.). In alkalischer Lösung wurde $[\alpha]_D^{20^\circ} = -6{\cdot}44^\circ$ gefunden.

Benzoyl-l-leucin, schmilzt getrocknet bei 105—107° (korr.). Die spezifische Drehung in alkalischer Lösung war $[\alpha]_D^{20^\circ} = +6{\cdot}59$.

Benzoyl-d-isoleucin. $C_{13}H_{17}NO_3$, farblose, lange Nädelchen, sehr schwer in kaltem, bedeutend leichter in heißem Wasser löslich, löslich in Alkohol, Äther und Aceton, in warmem Benzol und Toluol. Schmelzpunkt 116—117°. $[\alpha]_D^{20^\circ}$ in alkalischer Lösung $= +26{\cdot}36^\circ$.

Benzoyl-dl-phenylalanin. Schmelzpunkt 187—188° (korr.).

Benzoyl-d-phenylalanin. Aus Wasser farblose Nadeln, die bei 145—146° (korr.) schmelzen. In alkalischer Lösung ist $[\alpha]_D^{20^\circ} = -17{\cdot}1^\circ$.

dl-Benzoyl-α-aminobuttersäure:

$$\begin{array}{c} CH_3.CH_2.CH.COOH \\ | \\ NH.CO\,C_6H_5 \end{array}$$

wird in üblicher Weise erhalten; bildet, aus heißem Wasser umkristallisiert, Kristalle, die bei 140° sintern und bei 145—146° (korr.) schmelzen. Ziemlich gut löslich in heißem Wasser, sehr leicht löslich in Alkohol, Aceton, Essig und Chloroform, sehr schwer löslich in Äther. Mit Kupferacetat bildet sie in wässeriger Lösung ein gut kristallisierendes grünes Salz.

d-Benzoyl-α-aminobuttersäure:

$$\begin{array}{c} C_6H_5.CO.NH \\ | \\ CH_3.CH_2.CH\,COOH. \end{array}$$

Schmelzpunkt 120—121° (korr.). Die Verbindung ist sowohl in Wasser als auch in anderen Lösungsmitteln leichter löslich als der Racemkörper. Sie dreht nach rechts; in alkalischer Lösung ist $[\alpha]_D^{20^\circ} = +30{\cdot}75^\circ$.

l-Benzoyl-α-aminobuttersäure: Aus Wasser umkristallisiert, schmilzt die Verbindung bei 120—121° (korr.), also genau wie der optische Antipode. Ebenso ist das Verhalten gegenüber Lösungsmitteln das gleiche wie bei der d-Verbindung. Die Substanz dreht in alkalischer Lösung nach links: $[\alpha]_D^{20^\circ} = -31{\cdot}8^\circ$.

dl-Benzoyl-α-amino-n-capronsäure, $CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH(NH.CO\,C_6H_5).COOH$. Schmelzpunkt 134° (korr.). Aus Äther und Ligroin

oder aus heißem Wasser umkristallisiert kleine, längliche Blättchen, die in Alkalien und Ammoniak leicht löslich sind. Bariumsalz: in kaltem Wasser ziemlich leicht löslich: Silbersalz: in kaltem Wasser schwer, in heißem ziemlich leicht löslich: Kupfer- und Bleisalz: in Wasser sehr schwer löslich.

l-Benzoyl-α-amino-n-capronsäure:

$$\begin{array}{r} C_6H_5.CO.NH \\ | \\ CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH.COOH. \end{array}$$

Aus heißem Wasser umkristallisiert, werden schöne lange farblose Nadeln mit $^1/_3$ Molekül Kristallwasser erhalten, das zum Teil im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure, zum anderen Teil erst beim Trocknen bei 100° entweicht. Die kristallwasserhaltige Substanz schmilzt bei 53° (korr.). Die Verbindung ist in Alkohol zerfließlich, ziemlich leicht löslich in Äther, schwer löslich in Ligroin, ziemlich gut löslich in heißem Wasser. Die kristallwasserhaltige Verbindung dreht in alkalischer Lösung nach links: $[\alpha]_D^{20^\circ} = -21{\cdot}9^\circ$.

d-Benzoyl-α-amino-n-capronsäure:

$$\begin{array}{r} C_6H_5.CO.NH \\ | \\ CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.CH.COOH. \end{array}$$

Die Kristalle schmelzen ebenso wie das optisch Isomere bei 53° (korr.) und enthalten Kristallwasser, das bei 100° völlig entweicht. Optisches Verhalten: in alkalischer Lösung $[\alpha]_D^{20^\circ} = +21{\cdot}4^\circ$.

Benzoyl-α-aminoisovaleriansäure, $(CH_3)_2CH.CH.(NH.CO.C_6H_5).COOH$, wird aus Benzoylchlorid und Natriumkarbonat mit der Aminosäure erhalten. Zur Trennung von der Benzoesäure wird die ätherische Lösung mit Petroläther gefällt. Schmelzpunkt 132·5° (korr.). Die Verbindung ist in Äther und Alkohol ziemlich leicht löslich, sehr schwer löslich in Wasser auch in der Hitze, so gut wie unlöslich in Ligroin.

Sie kristallisiert aus Äther auf Zusatz von Ligroin in schönen Blättchen.

Benzoyl-α-amino-n-valeriansäure, $CH_3.(CH_2)_2.CH.(NH.CO.C_6H_5).COOH$, wird dargestellt mit Benzoylchlorid und Bikarbonat oder noch leichter aus dem Ester, den man in der 6fachen Menge Wasser löst, mit $^5/_4$ Molekül Bikarbonat und $^5/_4$ Molekül Benzoylchlorid. Der sich als Öl ausscheidende benzoylierte Ester wird durch Kochen mit Kalilauge verseift; beim Ansäuren fällt die Benzoylaminovaleriansäure aus, die durch Lösen in Äther und Fällen mit Ligroin von den kleinen anhaftenden Mengen Benzoesäure befreit wird. Die Löslichkeit ist ungefähr die gleiche wie bei der Verbindung der Isosäure: Schmelzpunkt 152·5° (korr.).

Benzoyl-α-aminomethyläthylessigsäure. Die Ausbeute ist bei Anwendung des Esters (wie bei der n-Valeriansäure beschrieben) bedeutend besser als bei der direkten Benzoylierung. Aus heißem Wasser umkristallisiert, schmilzt der Körper bei 189 199° (korr.); er ist in ungefähr 300 Teilen kochenden Wassers löslich, ziemlich leicht in heißem Alkohol, schwer in Äther.

Benzoyl-β-aminoisovaleriansäure. Aus Wasser umkristallisiert werden schiefe, bei 141·5° schmelzende Blättchen erhalten. Löslich in ungefähr 70 Teilen kochenden Wassers, ziemlich leicht löslich in Äther, sehr schwer löslich in Ligroin.

Dibenzoyl-d-arginin, $C_6H_{12}(C_6H_5CO)_2N_4O_2$, lange Nadeln oder Tafeln, unter Zersetzung bei 217·5—218° schmelzend. In Wasser schwer löslich.

Monobenzoyl-d-ornithin, $C_5H_{11}(COC_6H_5)N_2O_2$, wird durch Kochen der Ornithursäure mit Salzsäure erhalten. Farblose, in Wasser leicht, in Alkohol sehr schwer lösliche Nadeln, die bei 225—230° schmelzen.

Dibenzoyl-d-ornithin = Ornithursäure $C_5H_{10}N_2O_2(C_6H_5CO)_2$. Kleine Nadeln, leicht löslich in heißem Alkohol, schwer löslich in heißem Wasser, unlöslich in Äther. Schmelzpunkt 184°.

Dibenzoyl-cystin, $C_6H_{10}N_2S_2O_4(C_7H_5O)_2$, aus Alkohol feine, verwachsene Nadeln, die in Wasser unlöslich, in Äther schwer löslich, in alkoholhaltigem Äther und Alkohol mäßig leicht löslich sind, vom Schmelzpunkt 180—181°.

Dibenzoyl-l-tyrosin, $C_{23}H_{19}O_5N$. In Wasser unlösliche, in Alkohol leicht lösliche mikroskopische Kristalle vom Schmelzpunkt 211—212°.

Benzoyl-triglycyl-glycin, erhalten durch Lösen von 1 *g* Triglycylglycin mit 2·6 *g* Natriumbikarbonat in 40 *cm*³ Wasser und Zugabe von 1·7 *g* Benzoylchlorid tropfenweise unter Schütteln. Die durch Ansäuren erhaltene Benzoylverbindung wird aus der 40fachen Menge Wasser umgelöst. Sie schmilzt dann bei 235°. Durch Erwärmen mit alkoholischer Salzsäure wird der Ester erhalten, der bei 217° (korr.) unter Braunfärbung schmilzt.

Benzoyl-glycylglycin. Durch Benzoylieren von Glycylglycin mit Benzoylchlorid und Natronlauge. Die aus Wasser umkristallisierte Verbindung schmilzt bei 208° (korr.).

Durch Behandeln von Benzoylglycylglycin mit Acetylchlorid und Phosphorpentachlorid, Lösen des eingedampften und gewaschenen Reaktionsproduktes in kaltem Chloroform und Eintropfen unter Schütteln in eine verdünnte und gekühlte ätherische Lösung von überschüssigem Glykokollester wird der

Benzoyl-diglycylglycinester erhalten, nach Umkristallisieren aus Wasser feine farblose Nadeln, welche bei 173° (korr.) schmelzen.

Benzoyl-leucyl-alanyl-glycin A wird durch Behandeln des Tripeptids mit Natriumbikarbonat und Benzoylchlorid gewonnen. Aus siedendem Wasser umkristallisiert Tafeln und Blättchen, die 1 Molekül Kristallwasser enthalten, das sie beim Erhitzen auf 110° im Vakuum verlieren. Schmelzpunkt liegt scharf bei 194·5—195·5° (korr.). Die Substanz ist sehr leicht löslich in Alkohol, schwerer in Wasser und Essigäther, sehr schwer in Äther und Petroläther.

Benzoyl-leucyl-alanyl-glycin B wird genau wie die vorhergehende Verbindung dargestellt. Aus der 100fachen Menge kochenden

Wassers ungelöst kristallisiert sie in feinen, langen, meist zu Büscheln verwachsenen Nadeln ohne Kristallwasser, die bei 209—210° (korr.) schmelzen. Leicht löslich in Alkohol, schwerer in Wasser, fast unlöslich in Äther, Chloroform und Petroläther.

Benzoyl-leucyl-glycin, $C_4H_9.CH.NH(CO C_6H_5)CO.NH.CH_2.COOH$. Aus Leucylglycin mit Natriumbikarbonat und Benzoylchlorid. Der Körper fällt, wenn er aus heißem Wasser umkristallisiert wird, in zentimeterlangen zu Büscheln vereinigten Nadeln aus, die bei 167° (korr.) schmelzen. Die Verbindung ist fast unlöslich in Äther und Petroläther, schwer löslich in Chloroform und Benzol, leicht löslich in Alkohol.

Benzoyl-alanyl-alanin. $C_6H_5.CO.HN.CH(CH_3).CO.NH.CH(CH_3).COOH$. Wird durch Benzoylierung des Dipeptids und Natronlauge gewonnen. Die direkt erhaltene Verbindung schmilzt gegen 190°; wiederholt aus heißem Wasser umkristallisiert, steigt der Schmelzpunkt auf 203—204°. Aus Wasser farblose, feine Nadeln; die kalte wässerige Lösung zeigt deutlich saure Reaktion. Durch Kochen der in heißem Wasser gelösten Verbindung mit gefälltem Kupferoxyd und Einengen der Lösung auf dem Wasserbad wird ein grünes Kupfersalz erhalten: mikroskopische verwachsene Nadeln. Es ist in Wasser sehr schwer löslich; durch Zusatz von Natronlauge entsteht eine kornblumenblaue Färbung.

Benzoyl-alanyl-alaninester wird aus der Benzoylverbindung durch Verestern mit absolutem Alkohol und gasförmiger Salzsäure erhalten. Farblose, rosettenartig verwachsene Nadeln, die bei 114—116° (korr.) schmelzen.

Ameisensäure, H.COOH.

Findet sich im Körper der Ameise, besonders Formica rufa L., ferner in den Haaren vieler Raupen, in den Drüsenharen der Brennessel, ist auch sonst im Tier- und Pflanzenreich ziemlich verbreitet. Sie wird technisch aus Oxalsäure mit Glycerin gewonnen, wobei ein Ameisensäureglycerinester, das Monoformin, entsteht, das in Glycerin und Ameisensäure verseift wird. Ameisensäure bildet eine klare, farblose Flüssigkeit von stechendem, nicht brenzlichem Geruch und stark saurem Geschmack. Sie erstarrt bei 0° kristallinisch, um bei 8·5° wieder zu schmelzen. Siedepunkt 99°; die Dämpfe der Ameisensäure sind brennbar. Ameisensäure muß völlig flüchtig sein; sie ist in zugeschmolzenen oder mit Glasstopfen fest verschlossenen Flaschen aufzubewahren.

Über die Darstellung von Verbindungen der Ameisensäure mit Aminosäuren, der Formylverbindungen, vgl. *Abderhalden*, dieses Handbuch, Bd. 2, S. 496.

Formylglycin. $CHO.NH.CH_2.COOH$. Aus Essigester umkristallisiert, schmilzt es bei 153—154° (korr.) unter Gasentwicklung. Leicht löslich in Wasser und Alkohol in der Hitze, ziemlich schwer löslich in Aceton und Essigester, sehr schwer löslich in Äther und Benzol. Es schmeckt stark sauer.

Formyl-dl-leucin. Es wird bei 112° weich und schmilzt bei 114—115° (korr.). Es ist sehr leicht löslich in absolutem Alkohol und heißem Wasser, ziemlich leicht löslich in heißem Essigester, ziemlich schwer in Äther, Benzol und Chloroform, fast unlöslich in Petroläther. Es kristallisiert bei langsamem Abkühlen in wässeriger Lösung in oktaederähnlichen mikroskopischen Kristallen. Es reagiert sauer.

Formyl-d-leucin entspricht in seiner Darstellung und den Löslichkeitsverhältnissen dem inaktiven Produkt. Aus diesem kann es über das Brucinsalz erhalten werden. Aus warmem Wasser Kristalle, die unter dem Mikroskop als schmale Prismen erscheinen. Der Schmelzpunkt liegt bei 141—144° (korr.); bei 137° tritt Erweichung ein. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Wasser wurde für die alkoholische Lösung gefunden: $[\alpha]_D^{20^\circ} = +18{\cdot}8^\circ$.

Formyl-l-leucin entspricht in Kristallform, Schmelzpunkt und Lösungsverhältnisse der d-Verbindung. In absolutem Alkohol ist die Drehung: $[\alpha]_D^{20^\circ} = -18{\cdot}4^\circ$. Die aktiven Formylleucine geben in alkalischer Lösung eine bedeutend höhere Drehung, die jedoch nicht genau festzustellen ist, da unter diesen Verhältnissen schon bei niederer Temperatur eine langsame Abspaltung der Formylgruppe stattfindet.

Formyl-d-valin. Aus heißem Wasser beim Abkühlen kleine Prismen, aus verdünnter wässeriger Lösung nach längerem Stehen ziemlich große Prismen, die gegen 150° sintern und bei 156° geschmolzen sind. $[\alpha]_D^{20^\circ} = +13{\cdot}27^\circ$ in alkoholischer Lösung.

Formyl-d-isoleucin, $CH_3 . CH(C_2H_5) . CH(NH . COH) . COOH$. Aus Wasser feine Nadeln, aus Alkohol durchscheinende Kristalle, die bei 154° sintern, bei 156° schmelzen. In absolut alkoholischer Lösung ist $[\alpha]_D^{20^\circ} =$ [illegible] 25·41°.

Formyl-l-phenylalanin, $C_{10}H_{11}NO_3$. Aus warmem Wasser schiefe, vierseitige Täfelchen mit Seidenglanz, die bei 165° sintern, gegen 167° schmelzen. In alkoholischer Lösung ist $[\alpha]_D^{20^\circ} = +75{\cdot}2^\circ$.

Formyl-leucylglycin entsteht als anfangs sirupöses, später kristallisierendes Produkt, das sich von dem Dipeptid durch die große Löslichkeit in Wasser unterscheidet. Die Formylgruppe wird sehr leicht abgespalten.

Triketohydrindenhydrat, $C_6H_4<\genfrac{}{}{0pt}{}{CO}{CO}>C(OH)_2$.

Die Darstellung erfolgt über das durch Einwirkung von p-Nitrosodimethylanilin auf α-Hydrinden gewonnene 2 : 3-bis-(p-Dimethylaminoanilo)-α-hydrindenhydrat, $C_{25}H_{26}O_2N_4$, durch Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure [*Ruhemann*, Journ. of the Chem. Soc., 97, 1449 (1910)]. Dieses Produkt ist von *Ruhemann* zum Nachweis von Eiweißstoffen, Peptonen und Aminosäuren angewendet worden. Nach *Abderhalden* (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 72, S. 37) wird eine Lösung von 0·1 g des Reagens in 30—40 cm³ Wasser benutzt, zu der zu prüfenden Flüssigkeit (1 cm³) 1—2 Tropfen der

Lösung hinzugegeben und kurze Zeit zum Sieden erhitzt. Bei positivem Ausfall der Reaktion zeigt sich nach dem Abkühlen eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung. Damit die Reaktion gelingt, ist es nötig, daß die Lösung neutral ist. Bei saurer Reaktion tritt ein rötlicher Stich, eventuell Rotviolett- bis Rotfärbung ein. Bei alkalischer Reaktion wird das Auftreten einer Färbung verhindert. Die Reaktion fällt positiv aus mit Eiweißstoffen, Peptonen, Polypeptiden, den α-Aminosäuren mit Ausnahme des Prolin, Oxyprolin und der Pyrrolidonkarbonsäure, die keine Amino-, sondern eine Iminogruppe besitzen. Die Reaktion fällt positiv aus bei Körpern, die mindestens eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe besitzen. Neutralsalze stören nicht. Grenzen der Empfindlichkeit: Glykokoll 1 : 10.000, Alanin 1 : 10.000, l-Tyrosin 1 : 5000. Purinbasen, Harnsäure, Uracil geben keine Blaufärbung, ebensowenig Glukosamin, während die Reaktion bei Glukosaminsäure positiv ausfällt.

Die Reaktion ist auch anwendbar bei Harn und Blut.

Eine Kontrolle unter Zusatz der eben noch gerade nachweisbaren Menge einer Aminosäure wird empfohlen.

Dinitrochlorbenzol, $C_6H_3Cl(NO_2)_2$:

```
            H
            C
       HC ⁄    C.Cl

NO2.C ⟍   ⁄ C.NO2
            C
            H
```

Bei Einwirkung von Dinitrochlorbenzol auf Aminosäuren entstehen nach *Abderhalden* und *Blumberg* (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. **65**, S. 318) charakteristische Derivate. Man bringt 1 Mol. der Aminosäure in feingepulvertem Zustand zusammen mit 2 Mol. Natrium- oder Kaliumkarbonat und etwas Wasser in einen Rundkolben, erwärmt bis zur Lösung, fügt 1 Mol. Dinitrochlorbenzol in der 15fachen Menge Alkohol warm gelöst zu und kocht zwei Stunden am Rückflußkühler. Von einem eventuell bleibenden Rückstand wird abfiltriert, das Filtrat auf dem Wasserbad verdampft, nach Erkalten in kaltem Wasser gelöst, filtriert, und das Filtrat kochend mit einem kleinen Überschuß von verdünnter Salzsäure versetzt. Die gewonnene Substanz wird durch Lösen in Eisessig und Fällen mit Wasser gereinigt.

2.4-Dinitrophenyl-glycin, goldgefärbte Kristalle vom Schmelzpunkt 205°, wenig löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser, sehr leicht in Aceton, Methylalkohol, Äthylalkohol und Eisessig.

2.4-Dinitrophenyl-glycinester, aus Alkohol grünlichgelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 144°.

2.4-Dinitrophenyl-dl-alanin, goldgelbe Blättchen von gleichen Lösungsverhältnissen wie das Glykokollderivat; Schmelzpunkt 178°.

2.4-Dinitrophenyl-dl-valin, goldgelbe Blättchen vom Schmelzpunkt 185°.

2.4-Dinitrophenyl-dl-leucin, gelbe, grünlich schimmernde Kristalle, die bei 203° schmelzen. Schwer löslich in Wasser, mäßig löslich in kaltem, sehr leicht in warmem Methyl- und Äthylalkohol sowie Eisessig, leicht löslich in Aceton und Methyläthylketon.

2.4-Dinitrophenyl-asparagin, gelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 191—192°.

Bei Einwirkung von Dinitrochlorbenzol auf Histidin entstehen zwei Produkte, ein Mono- und ein Triderivat, grünlichgelbe Kristalle vom Schmelzpunkt 250°, aus 2 Mol. Dinitrochlorbenzol und 1 Mol. Histidin, lange prachtvoll rote Nadeln, die in Wasser unlöslich sind.

Pikrinsäure, Trinitrophenol, $C_6H_2(NO_2)_3OH$:

NO_2

NO_2 OH

NO_2

Sie bildet sich beim Kochen der verschiedensten organischen Substanzen (Seide, Leder, Wolle, Harze, Anilin) mit konzentrierter Salpetersäure. Zur Darstellung wird Phenol in starker Schwefelsäure gelöst und diese Lösung in kleinen Mengen in Salpetersäure 1·4 eingetragen. Die Lösung wird auf dem Wasserbad erhitzt; beim Erkalten scheidet sich Pikrinsäure in gelben Blättchen aus.

In festem Zustand nur wenig, in Lösungen stark gelb gefärbt. Schwer löslich in kaltem Wasser, löslich in Alkohol, leicht löslich in Essigester. Schmelzpunkt 122°. Bei raschem Erhitzen verpufft sie. Sie ist unzersetzt sublimierbar; mit Wasserdämpfen ist sie nicht flüchtig. Nach *Krauch-Merck* muß Pikrinsäure folgenden Proben entsprechen: 1 g soll sich in 100 cm^3 Wasser klar lösen; bei Versetzen mit 1—2 Tropfen verdünnter Schwefelsäure darf nach 12stündigem Stehen keine Ausscheidung erfolgen. In 20 cm^3 Benzol muß sich 1 g Pikrinsäure klar lösen. Die Lösung von 1 g Pikrinsäure in 100 cm^3 Wasser darf mit Calciumchloridlösung nach 2stündigem Stehen keinen Oxalatniederschlag geben. Zur Prüfung auf freie und gebundene Schwefelsäure werden 2 g Pikrinsäure mit 10 cm^3 Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·4 versetzt und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 100 cm^3 siedendem Wasser gelöst unter Zusatz von 5 cm^3 Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·153, nach dem Erkalten filtriert und das Filtrat mit Baryumnitratlösung versetzt. Es darf keine sofortige Trübung eintreten. Zur Bestimmung etwaiger anorganischer Verunreinigungen verbrennt man 1 g Pikrinsäure vorsichtig in einer offenen Platinschale; es darf nicht mehr als 0·001 g Rückstand bleiben.

Anwendung als Eiweißfällungsmittel nach Ansäuerung mit einer organischen Säure. Zur annähernden quantitativen Eiweißbestimmung im Harn dient das Reagens von *Esbach* (Lösung von 1 Teil Pikrinsäure, 2 Teilen Zitronensäure auf 100 Teile Wasser). Pikrinsäure fällt außer Basen auch

Phenole, Kohlenwasserstoffe etc. Besonders angewendet zur Isolierung physiologisch wichtiger — besonders Fäulnisbasen (s. unten). Zur qualitativen Prüfung auf Kreatinin wird etwas gesättigte Pikrinsäurelösung dem zu untersuchenden Harn zugefügt und mit Natronlauge alkalisch gemacht. Dunkelorange Färbung, die beim Erhitzen schneller auftritt.

Methylaminpikrat. $CH_3 NH_2 . C_6 H_2 (NO_2)_3 OH$. Schmelzpunkt 207°.

Dimethylaminpikrat. $(CH_3)_2 NH . C_6 H_3 N_3 O_7$. Schmelzpunkt 156°. Ist im Gegensatz zum Pikrat des Methylamins in Wasser ziemlich gut löslich.

Trimethylaminpikrat. $(CH_3)_3 N . C_6 H_3 N_3 O_7$. Schmelzpunkt 216°. In Wasser mäßig löslich.

Tetramethylendiaminpikrat. $C_4 H_{12} N_2 . [C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH]_2$, zersetzt sich bei 250°. Schwer löslich in Wasser.

Pentamethylendiaminpikrat, $C_5 H_{14} N_2 . [C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH]_2$, Schmelzpunkt 221°. Aus Wasser dünne Nadeln oder langgestreckte Tafeln.

Neuridinpikrat, $C_5 H_{14} N_2 . [C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH]_2$, beginnt sich bei 230° zu bräunen, ist bei 250° verkohlt. In Wasser sehr schwer löslich und daher zur Trennung vom Cholin, dessen Pikrat leicht löslich ist, geeignet.

Trimethylaminoxydpikrat. $C_3 H_9 NO . C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH$. Schmelzpunkt 197°, schwer löslich in Alkohol und kaltem Wasser.

Kreatininpikrat. $C_4 H_7 N_3 O . C_6 H_3 N_3 O_7$, Schmelzpunkt 212—213°, in Wasser schwer löslich.

Pikrylglykokoll. $(NO_2)_3 . C_6 H_2 - NH . CH_2 . COOH$, gelbe Nadeln, Schmelzpunkt 161°.

Pikryl-α-aminoisovaleriansäure. $(NO_2)_3 . C_6 H_2 - NH - C_4 H_8 . COOH$, rötliches Öl, zu gelben Nadeln vom Schmelzpunkt 171° erstarrend. Leicht löslich in Alkohol und Äther, schwer in Wasser.

d-Argininpikrat, $C_6 H_{14} N_4 O_2 . C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH$. Schmelzpunkt 205—206°.

Dipikrylarginin. $[(NO_2)_3 . C_6 H_2 . NH]_2 . C_6 H_{12} N_4 O_2$, undeutlich kristallisierende Masse, wenig löslich in Alkohol, Äther, Wasser.

Lysinpikrat. $C_6 H_{14} N_2 O_2 . C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH$, zur Identifizierung gut geeignet, gelbe Nadeln, ziemlich schwer in Wasser löslich, leichter im Überschuß von Pikrinsäure. Verpufft bei 252°

dl-Ornithinpikrat, $C_5 H_{12} N_2 O_2 . C_6 H_2 (NO_2)_3 OH$, Schmelzpunkt 195°.

Guanidinpikrat, $CN_3 H_5 . C_6 H_2 (NO_2)_3 . OH$, Schmelzpunkt 315°.

Dipikryl-l-histidin, $[(NO_2)_3 . C_6 H_2]_2 . C_6 H_7 N_3 O_2$, später kristallinisch werdende ölige Masse.

Brenzschleimsäurechlorid:

$$C_4 H_3 O . CO . Cl = \begin{array}{l} HC = CH \\ \quad\quad\quad \searrow O \\ HC = C \nearrow \\ \quad\quad\quad\; CO . Cl \end{array}$$

Anwendung zur Furoylierung der Aminosäuren bzw. Amine unter Benutzung der *Schotten-Baumann*schen Methode. In manchen Fällen anderen Methoden sehr überlegen.

Furoyl-Asparagin, aus Wasser farblose, gut ausgebildete vierkantige Prismen, unlöslich in Alkohol, Äther, Ligroin. Schmelzpunkt 172—175°. Ausbeute 96% der theoretischen Menge.

Pikrolonsäure, 1-p-Nitrophenyl-3-methyl-4-isonitro-5-pyrazolon):

NO_2

N

N   CO

CH_3 — C   C = N — OH

Darstellung durch Eintragen von wiederholt aus Alkohol umkristallisiertem Phenylmethylpyrazolon in 90%ige Salpetersäure, wobei der Salpetersäureester entsteht, der mit 33%iger Essigsäure auf dem Wasserbad verseift wird. Die Säure wird über das Natriumsalz gereinigt; feine gelbe Nädelchen, die durch Erwärmen mit 20%iger Salzsäure zerlegt werden. Die Pikrolonsäure scheidet sich dabei als gelbes, mehliges Pulver ab. Zersetzt sich bei raschem Erhitzen bei zirka 124°.

Gut löslich in Äthylalkohol, etwas schwerer in Wasser, Methylalkohol, am schwersten in Äther (200 Teile). Leicht löslich in siedendem Methyl- und Äthylalkohol. Pikrolonsäure dient zur Charakterisierung von Basen und Alkaloiden. Hierzu werden die meist alkoholischen Lösungen der Komponenten zusammengegossen; es bilden sich schwer lösliche, gut kristallisierende, gelbe bis rote Salze, die beim Erhitzen sich stürmisch zersetzen.

Methylguanidinpikrolonat wird aus der wässerigen Lösung der Komponenten erhalten. $C_2H_7N_3 . C_{10}H_8N_4O_5$, mikroskopische Nadeln, drusenförmig angeordnet. Schmelzpunkt zirka 270°, sehr schwer löslich in Wasser, leichter in absolutem Alkohol.

Dimethylguanidinpikrolonat, $C_3H_9N_3 . C_{10}H_8N_4O_5$, auf gleiche Weise gewonnen, dem genannten sehr ähnlich.

Methylaminpikrolonat, $CH_3 . NH_2 . 2 C_{10}H_8N_4O_5$. Zersetzungspunkt 244°.

Dimethylaminpikrolonat, $(CH_3)_2 N . H . C_{10}H_8N_4O_5$. Zersetzungspunkt 222°.

Trimethylaminpikrolonat, $(CH_3)_3 N . C_{10}H_8N_4O_5$. Zersetzungspunkt 250—252°.

Tetramethylendiaminpikrolonat (Putrescinpikrolonat), $NH_2 (CH_2)_4 NH_2 . 2(C_{10}H_8N_4O_5)$. Zersetzungspunkt 263°. Sämtlich schwer löslich in Wasser und Alkohol.

Pentamethylendiaminpikrolonat (Kadaverinpikrolonat), $NH_2 (CH_2)_5 NH_2 . 2(C_{10}H_8N_4O_5)$, orangegelbe Täfelchen, etwas leichter in Alkohol und Wasser löslich als die vorhergehenden.

d-Argininpikrolonat, $C_{10}H_8N_4O_5 . C_6H_{14} . N_4O_2 + H_2O$. Gelbe Nadeln, deren Kristallwasser bei 110° entweicht. Schwer löslich in Wasser, noch schwerer in Alkohol. Zersetzungspunkt 232°. Dient zur Identifizierung ebenso wie das

l-Histidinpikrolonat. $C_{10}H_8N_4O_5 . C_6H_9N_3O_2$. In Wasser schwer lösliche gelbe Nadeln. Schmelzpunkt 225°.

d.l-Ornithinpikrolonat. $C_5H_{12}N_2O_2 . C_{10}H_8N_4O_5 + 1^1/_2 H_2O$. Schmelzpunkt 220—221°.

Acetylchlorid, $CH_3 . CO . Cl$.

leicht bewegliche, farblose, stechend riechende Flüssigkeit. Spezifisches Gewicht bei 0° 1·13; Siedepunkt 55°. Es ist ohne Zersetzung destillierbar. Wichtiges Reagens zum Nachweis von Hydroxylgruppen in organischen Verbindungen: Überführung von Alkoholen und primären und sekundären Aminen in die Essigsäurederivate (Acetylierung). Durch Wasser geht es unter heftiger Reaktion in Essigsäure und Salzsäure über.

Essigsäureanhydrid, $\begin{matrix} CH_3 CO \\ CH_3 CO \end{matrix} > O$.

bewegliche, stechend riechende Flüssigkeit vom spezifischen Gewicht 1·073 bei 20°. Siedepunkt 137°. Bei gewöhnlicher Temperatur in ungefähr der 10fachen Menge Wasser löslich; es setzt sich in dieser Lösung unter Wasseraufnahme langsam in Essigsäure um. Es dient ebenso wie Acetylchlorid als Reagens auf die Hydroxylgruppe.

10 cm^3 Essigsäureanhydrid sollen keinen wägbaren Abdampfrückstand hinterlassen. Zur Prüfung auf Salzsäure verdünnt man 1 cm^3 mit 50 cm^3 Wasser, versetzt mit 5 cm^3 konzentrierter Salpetersäure und prüft mit Silbernitratlösung. Zur quantitativen Bestimmung verdünnt man 10 cm^3 mit Wasser auf 100 cm^3 und titriert 10 cm^3 dieser Mischung mit Normallauge mit Phenolphthalein als Indikator. Zur Neutralisierung sollen mindestens 19·3 cm^3 Normallauge verbraucht werden.

Essigsäure, $CH_3 COOH$.

Vorkommen im rohen Weinessig, in Pflanzensäften, im Schweiß, in tierischen Organen etc. Darstellung aus Alkohol durch Vermittlung gewisser Bakterien unter Luftzutritt, durch trockene Destillation des Holzes etc. Stark saure Flüssigkeit. Die reine Essigsäure erstarrt in der Kälte zu Kristallblättern, die bei 17° schmelzen. Spezifisches Gewicht bei 15° 1·055. Siedepunkt 118°. Der Dampf brennt mit blauer Flamme. Die reine Essigsäure wird auch „Eisessig" genannt. Beim Verdünnen mit Wasser steigt das spezifische Gewicht bis zu einem Gehalt der Lösung von 77% Säure (spezifisches Gewicht = 1·075 bei 15·5°); es nimmt dann wieder ab. Sehr hygroskopisch. Besonders unverdünnt außerordentlich ätzend. Cave Finger! Als Eisessig zur Hydroxylierung verwandt, sonst zu mannigfachen Reaktionen.

Prüfung auf Reinheit. 10 cm^3 Eisessig sollen keinen wägbaren Abdampfrückstand hinterlassen. Zur Prüfung auf Salzsäure stellt man eine 10%ige Lösung her und prüft nach Salpetersäurezusatz mit Silbernitrat; zur Prüfung auf Schwefelsäure kochend mit Baryumchloridlösung. Schwermetall und Erden werden nachgewiesen, indem man in 20%ige Essigsäure Schwefelwasserstoff einleitet oder eine 10%ige Lösung mit Ammoniaklösung übersättigt. Im ersteren Falle muß die Lösung klar bleiben, im letzteren darf weder durch Schwefelammonium Grünfärbung, noch auf Zusatz von Ammoniumoxalatlösung eine Ausscheidung eintreten.

10 cm^3 einer 10%igen Essigsäure brauchen (Indikator Phenolphthalein) mindestens 16 cm^3 Normallauge zur Neutralisierung.

Phenylsulfochlorid, $C_6H_5 . SO_2 . Cl$

Es reagiert bei Gegenwart von Alkali nicht auf tertiäre Amine, dagegen auf sekundäre Amine, wobei in Alkali und Säuren unlösliche Phenylsulfonamide entstehen. Es reagiert mit primären, aliphatischen oder aromatischen Aminen unter Bildung von im Überschuß von Kalilauge leicht löslichen Sulfonamiden. Anwendung zur Bestimmung der Konstitution sowie zur Trennung eines Gemenges primärer, sekundärer und tertiärer Basen.

β-Anthrachinonsulfochlorid

$$C_6H_4 . (CO)_2 . C_6H_3 . SO_2 . Cl =$$

Darstellung aus durch wiederholtes Umkristallisieren gereinigtem anthrachinonsulfosauren Natrium mit Phosphorpentachlorid. Es bildet aus siedendem Toluol kristallisiert, schwach gelbe Blättchen vom Schmelzpunkt 193°.

Es reagieren mit β-Anthrachinonsulfochlorid nur primäre und sekundäre Amine, erstere unter gelber bis gelbroter Färbung, so daß die Reaktion eine Unterscheidung erlaubt. Tertiäre Basen reagieren nicht. Ebensowenig können damit nachgewiesen werden Aminosäuren und schwach basische Substanzen.

Sulfanilsäure, $C_6H_4 \langle {NH_2 \atop SO_3H}$

wird durch Erhitzen von Anilin mit rauchender Schwefelsäure hergestellt. Kristallwasserhaltig. Bildet in Wasser ziemlich schwer lösliche, rhombische verwitternde Kristalle. Bei der Kalischmelze entsteht Anilin. Durch Oxydation mit Chromsäure geht sie in Chinon über. Auf Zusatz von salpetriger Säure entsteht Sulfodiazobenzol, das sich mit einer großen Reihe aromati-

scher Amine und Phenole zu Farbstoffen vereinigt. Anwendung für *Ehrlichs* „Diazoreaktion“:

Reagentien: I. Sulfanilsäure 5·0 — II. Natriumnitrit 0·5
Salzsäure 1·19 : 50·0 — Dest. Wasser ad 100·0.
Dest. Wasser ad 1000·0.

Vorschrift: 50 *cm*³ Lösung I + 1 *cm*³ Lösung II werden gemischt, und gleiche Volumina dieser Lösung und von Harn zusammengegossen, dazu 1/8 Teil 25% Ammoniak gefügt und gut durchgeschüttelt. Ist die Reaktion „positiv“, so färbt sich der Schüttelschaum tief rot.

Statt Sulfanilsäure wird empfohlen Paraamidoacetophenon in 0·5‰iger Lösung.

Benzoësäureanhydrid, $\frac{C_6H_5CO}{C_6H_5CO}>O$.

bildet in Wasser unlösliche Prismen vom Schmelzpunkt 39°; es siedet unzersetzt. Beim Kochen mit Wasser wird es hydrolysiert. Anwendung zur Benzoylierung: die hydroxylhaltige Substanz wird in offenen Kölbchen 1—2 Stunden auf 150°, in anderen Fällen im Schießrohr auf 190—200° erhitzt.

Nitroprussidnatrium, $FeCy_5(NO)Na_2 + 2H_2O$.

Natriumsalz der Nitroprussidwasserstoffsäure, die durch Oxydation von Ferrocyankalium mittelst Salpetersäure entsteht. Es bildet rote wasserlösliche Prismen.

Nitroprussidnatrium ist bisweilen durch Sulfat verunreinigt. Zum Nachweis säuert man eine 2%ige wässerige Lösung mit Salzsäure an und prüft mit Bariumchloridlösung.

Reagens auf Schwefelwasserstoff: In alkalischer Lösung purpurblaue Färbung, die mit der Zeit meist verschwindet.

Aceton und primäre Amine geben rotviolette Färbung. Reagens auf Kreatinin. Bei starkem Ansäuren mit Essigsäure verschwindet die Färbung; beim Erhitzen Grünfärbung, nach Stehen blauer Satz. Sekundäre und tertiäre Amine geben zum Teil orangerote Färbung. Aliphatische Amine geben mit einer Lösung von Nitroprussidnatrium nach Zusatz von Brenztraubensäure veilchenblaue, auf Zusatz von Essigsäure blau werdende Färbung, die rasch verschwindet.

Ferrocyankalium, $K_4FeCy_6 + 3H_2O$.

gelbes Blutlaugensalz, entsteht durch Versetzen von Eisenvitriollösung mit überschüssigem Cyankalium; in der Technik wird es gewonnen durch Schmelzen stickstoffhaltiger organischer Körper mit Pottasche unter Zusatz von Eisen. Zitronengelbe, tetragonale Tafeln, die sich bei gewöhnlicher Temperatur in 4 Teilen Wasser, in heißem Wasser noch bedeutend leichter, lösen. Beim Trocknen bei 100—110° verliert es sein Kristallwasser und verwandelt sich dabei in eine weiße Masse. Die wässerige Lösung verändert sich beim Stehen.

Ferrocyankalium kann verunreinigt sein durch Pottasche (beim Übergießen mit verdünnter Schwefelsäure tritt in diesem Falle Gasentwicklung (Kohlensäure) auf; durch Sulfat: man prüft eine 5%ige mit Salzsäure angesäuerte Lösung mit Chlorbaryum; durch Chlorid: zum Nachweis wird ein Gemisch von 0·5 *g* gepulvertem Blutlaugensalz mit 1 *g* chlorfreiem Salpeter in einem zum Glühen erhitzten Porzellantiegel verpufft, wobei immer nur kleine Mengen eingetragen werden. Der Rückstand wird mit 20 *cm*³ Wasser aufgenommen, und das Filtrat nach Zusatz von 5 *cm*³ Salpetersäure mit Silbernitratlösung geprüft.

Anwendung als Eiweißfällungsmittel, analytisch: Reagens zur Ferrocyankaliumprobe.

Reagens auf tertiäre Basen der Fett- und Benzol-Reihe.

4. Anorganische Reagentien.

Platinchlorid (Platinchlorwasserstoffsäure) $H_2PtCl_6 + 6H_2O$ wird erhalten durch Lösung von Platin in Königswasser und Eindampfen bis zur Sirupkonsistenz unter wiederholtem Zusatz von HCl. Große rotbraune, sehr hygroskopische Prismen, leicht löslich in Wasser, Alkohol und Äther. Platinchlorid muß in Wasser mit reingelber Farbe löslich sein, es soll sich in der 10fachen Menge Alkohol klar lösen. Der Glührückstand ist unter Umständen auf die Gegenwart von Sulfat und Baryumsalzen nach den üblichen Methoden zu untersuchen. Zur Prüfung auf Nitrat werden 2 *cm*³ der 10%igen Lösung mit 2 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure gemischt, und diese Mischung mit 2 *cm*³ Ferrosulfatlösung überschichtet. Auch nach längerem Stehen darf an der Berührungsfläche der beiden Flüssigkeiten keine braunrote Zone entstehen. Beim Glühen von 2 *g* Platinchlorid sollen 0·752 *g* Rückstand bleiben. Die Schwerlöslichkeit des Kaliumsalzes (und Ammonium-, Rubidium- und Caesiumsalzes) im Gegensatz zu den Salzen des Natriums (kleine goldgelbe Oktaeder) dient zur Trennung von Kalium und Natrium. Das Kalium- und Ammoniumsalz ist auch, im Gegensatz zum Natriumsalz, in Alkohol unlöslich.

Platinchlorid dient u. a. zur Bestimmung und Reindarstellung organischer Basen.

Methylaminchlorplatinat $(CH_5N)_2 \cdot 2HCl\,PtCl_4$, hexagonale Tafeln, Schmelzpunkt 224°, schwer löslich in kaltem Wasser, unlöslich in Alkohol.

Dimethylaminchlorplatinat $(C_2H_7N)_2 \cdot 2HCl\,PtCl_4$, Schmelzpunkt 206°. Blättchen, mäßig löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser. In Alkohol etwas löslicher als die Verbindung des Methylamins.

Trimethylaminchlorplatinat $[(CH_3)_3N]_2 \cdot 2HCl\,PtCl_4$, Schmelzpunkt 190°. (Nach anderen Angaben Zersetzung bei 240°.) Gelbe Kristalle, in Alkohol etwas löslicher als die Platinate des Dimethylamins und Monomethylamins.

Tetramethylendiaminchlorplatinat, $C_4H_{12}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, feine Prismen oder hexagonale Blättchen, schwer löslich in Wasser.

Pentamethylendiaminchlorplatinat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, Schmelzpunkt 215°. Prismen oder Nadeln aus Wasser, in diesem wenig löslich.

Neuridinchlorplatinat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, Nadeln, leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol.

Gerontinchlorplatinat, $C_5H_{14}N_2 . 2HCl . PtCl_4$, nadelförmige Kristalle.

Mydatoxinchlorplatinat, $C_6H_{13}NO_2 . 2HCl . PtCl_4$, Schmelzpunkt 193°, in Wasser ziemlich leicht löslich.

Gadininchlorplatinat, $C_7H_{17}NO_2 . 2HCl . PtCl_4$, Schmelzpunkt 214°, in Wasser schwer löslich.

Viridininchlorplatinat, $(C_8H_{12}N_2O_3)_2 . 2HCl . PtCl_4$. Gelbe feine Nädelchen, die sich bei 212—216° schwärzen.

Tetaninchlorplatinat, $C_{13}H_{30}(NO_2)_2 . 2HCl . PtCl_4$, in Wasser ziemlich schwer löslich.

β-Alaninchlorplatinat, $(CH_2NH_2 . CH_2 . COOH)_2 . 2HCl . PtCl_4$, zersetzt sich bei 188°, kristallisiert aus Alkohol, Wasser und Salzsäure, in denen es leicht löslich ist, im Gegensatz zur Sarkosinverbindung in dunkelgelben Nädelchen.

Trimethylaminoxydchlorplatinat, $(C_3H_9NO)_2 . 2HCl . PtCl_4$, rhombische Blättchen, Schmelzpunkt 214°.

Kreatininchlorplatinat, $(C_4H_7N_3O)_2 . 2HCl . PtCl_4$, orangerote Prismen und Nadeln, Schmelzpunkt 220—225°, leicht löslich in Wasser, schwer löslich in Alkohol.

Betainchlorplatinat, $(C_5H_{11}NO_2)_2 . 2HCl . PtCl_4$, Schmelzpunkt 246°, leicht löslich in Wasser, schwer in Alkohol.

Carninchlorplatinat, $C_7H_8N_4O_3 . HCl . PtCl_4$.

Carnitinchlorplatinat, $(C_7H_{15}NO_3)_2 . 2HCl . PtCl_4$. Schmelzpunkt unter Zersetzung 214—218°.

Oblitinchlorplatinat, $C_{18}H_{38}N_2O_5 . 2HCl . PtCl_4$, zersetzt sich bei 230°, schwer löslich in kaltem, leicht in heißem Wasser, unlöslich in absolutem Alkohol.

Methylguanidinchlorplatinat, $[C_2H_7N_3 . HCl]_2 . PtCl_4$, monokline Prismen, ziemlich leicht löslich in Wasser und Alkohol.

Dimethylguanidinchlorplatinat, $(C_3H_9N_3 . HCl)_2 . PtCl_4$, leicht löslich in Wasser und Alkohol.

Methylpyridylammoniumhydroxydchlorplatinat, $(C_5H_5N . CH_3Cl)_2PtCl_4$, orangerote Tafeln oder lachsfarbene Blätter, Schmelzpunkt 205—207°. Unlöslich in Alkohol, schwer löslich in kaltem, leicht in heißem Wasser.

γ-Methylpyridinchlorplatinat, $(C_6H_7N . HCl)_2PtCl_4$, Schmelzpunkt 240°; schwer löslich in kaltem Wasser.

Akt. Lysinchlorplatinat, $C_6H_{14}N_2O_2 . 2HCl . PtCl_4 + C_2H_5OH$, gelbrote Prismen, bei 219—220° unter Zersetzung schmelzend.

Goldchlorid, $AuCl_3 \cdot HCl + 4H_2O$ (Aurichlorid)

entsteht bei der Einwirkung von Chlorgas auf Goldpulver bei 200° oder durch Auflösen von Gold in Königswasser. Es bildet eine kristallinische, zerfließliche, rotbraune Masse, die sich außer in Wasser auch in Alkohol und Äther leicht mit gelbroter Farbe löst; die Lösungen verändern sich jedoch bald. Löslich ferner in flüssigen Ölen. Die wässerige Lösung rötet Lackmuspapier. Beim Eindampfen der Lösung findet bereits teilweise Zersetzung statt, unter Bildung von $AuCl$ und Cl_2. Bei höherer Temperatur zerfällt auch das feste Salz in seine Komponenten.

Im Handel finden sich außer dem reinen gelben Goldchlorid mit obiger Formel noch verschiedene Natriumgoldchlorid-Präparate.

Zur Prüfung auf Verunreinigungen glüht man das Goldchlorid, behandelt das rückständige metallische Gold mit Salpetersäure und prüft in der Lösung auf Verunreinigungen. Goldchlorid ist in gut verschlossenen Gläsern, am besten eingeschmolzen, aufzubewahren.

Goldchlorid fällt als Schwermetallsalz Eiweiß; es wirkt in mäßiger Lösung auch antiseptisch. Wichtig sind die Doppelsalze, die es mit organischen Basen bildet, und die vielfach sehr charakteristisch sind.

Methylguanidinchloraurat, $C_2H_7N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$, rhombische Kristalle vom Schmelzpunkt 198°, schwer löslich in Wasser, Alkohol, leicht in Äther.

Dimethylguanidinchloraurat, $C_3H_9N_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$. Tafeln oder Blättchen vom Schmelzpunkt 144°.

Methylpyridylammoniumhydroxydchloraurat, $C_5H_5N \cdot CH_3Cl \cdot AuCl_3$. Nadeln vom Schmelzpunkt 252—253°, sehr schwer löslich in kaltem, ziemlich schwer löslich in heißem Wasser.

γ-Methylpyridinchloraurat, $C_5H_4N \cdot CH_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$. Prismen vom Schmelzpunkt 201—203°, sehr schwer löslich in Wasser.

Reduktonovainchloraurat, $C_7H_{16}NOCl \cdot AuCl_3$. Blättchen und Nadeln, die bei 80° zu sintern anfangen, bei 155—160° schmelzen; die Schmelze wird erst bei 175—180° klar.

Vitiatinchloraurat, $C_5H_{14}N_6 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, gelbrote, glänzende Blätter, bei ungefähr 167° schmelzend, in Wasser ziemlich schwer löslich.

Gynesinchloraurat, $C_{18}H_{23}N_5O_3 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, vierseitige rotgelbe Säulen, Schmelzpunkt 180°; wird erst bei 205° klar.

Minginchloraurat, $C_{13}H_{18}N_2O_2 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, gelbrote vierseitige Säulen vom Schmelzpunkt 194°.

Cholinchloraurat, $C_5H_{14}NOCl \cdot AuCl_3$, gelbe Nadeln, schwer löslich in kaltem Wasser, ziemlich leicht löslich in heißem Wasser und heißem Alkohol. Schmelzpunkt 239—249°.

Novainchloraurat, $C_7H_{16}NO_2Cl \cdot AuCl_3$. Schmelzpunkt 135°. Ist dimorph: kleine, hellgelbe, mikroskopische Blättchen und kräftige vierseitige Säulen.

Oblitinchloraurat, $C_{18}H_{38}N_2O_5 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, glänzende hellgelbe Blätter vom Schmelzpunkt 107°; löslich in absolutem Alkohol, schwer in Wasser.

Dimethylaminchloraurat, $C_2H_7N \cdot HCl \cdot AuCl_3$, große, monokline Tafeln. Schmelzpunkt 202°.

Trimethylaminchloraurat, $(CH_3)_3N \cdot HCl \cdot AuCl_3$, Kristalle vom Schmelzpunkt 220°, wenig löslich in Wasser, leicht löslich in warmem Alkohol.

Tetramethylendiaminchloraurat, $C_4H_{12}N_2 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3 + 2H_2O$, Nadeln oder Blättchen, die unter Zersetzung bei 210° schmelzen. Schwer löslich in Wasser, schwerer als das entsprechende Salz des Pentamethylendiamins.

Pentamethylendiaminchloraurat, $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, Nadeln oder Prismen vom Schmelzpunkt 186—188°. In Wasser ziemlich leicht löslich.

Neuridinchloraurat, $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, in Wasser schwer löslich.

Typhotoxinchloraurat, $(C_7H_{17}NO_2)_2 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$. Prismen vom Schmelzpunkt 176°, in Wasser schwer löslich.

δ-Amino-n-valeriansäurechloraurat, $C_5H_{11}NO_2 \cdot HCl \cdot AuCl_3 + H_2O$, orangegefärbte monokline Kristalle vom Schmelzpunkt 86—87°, ziemlich leicht löslich in Wasser, schwer in Alkohol.

Viridininchloraurat, $C_8H_{12}N_2O_3$]. $HCl \cdot AuCl_3$, schwarzbraune, feine Kristallnadeln vom Schmelzpunkt 176°, leicht löslich in heißem, schwer in kaltem Wasser.

Marcitinchloraurat, $C_8H_{19}N_3 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, Schmelzpunkt 175 bis 178°.

Putrinchloraurat, $C_{11}H_{26}N_2O_3 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, harte, dunkelorangegefärbte Kristallkrusten vom Schmelzpunkt 109—110°.

Kreatininchloraurat, $C_4H_7N_3O \cdot HCl \cdot AuCl_3$, Schmelzpunkt 170 bis 174°, leicht löslich in Wasser und Alkohol, unlöslich in Äther.

Betainchloraurat, $C_5H_{11}NO_2 \cdot HCl \cdot AuCl_3$, Schmelzpunkt 224—235°; in kaltem Wasser schwer löslich. Es sind Golddoppelsalze mit anderem Schmelzpunkt bekannt.

Neosinchloraurat, $C_6H_{16}NOCl \cdot AuCl_3$, Schmelzpunkt 202—205°, leicht löslich in absolutem Alkohol, ziemlich leicht in heißem, sehr schwer in kaltem Wasser.

Carnitinchloraurat, $C_7H_{15}NO_3 \cdot HCl \cdot AuCl_3$, Schmelzpunkt 153 bis 154°.

Crangoninchloraurat, $C_{13}H_{26}N_2O_3 \cdot 2HCl \cdot 2AuCl_3$, Schmelzpunkt 130—140°.

Quecksilberchlorid, (Sublimat), $HgCl_2$.

Darstellung durch Lösen von Quecksilber in Königswasser ($HCl + HNO_3$) oder von Quecksilberoxyd in Salzsäure.

Es bildet farblose, rhombische Kristalle von scharf metallischem Geschmack. Löslich in 18 Teilen Wasser von 14°, leichter in wärmerem Wasser; 100 Teile siedendes Wasser lösen ungefähr 54 Teile Sublimat. Lösungen in destilliertem Wasser halten sich lange. Löslich in 3 Teilen Alkohol. Sublimat ist außerordentlich giftig. Vorsichtig aufbewahren!

Man prüft auf durch Schwefelwasserstoff nicht fällbare Verunreinigungen, indem man in die Lösung von 5 g Quecksilberchlorid in 100 cm³ Wasser und 5 cm³ Salzsäure (verdünnte) bis zur völligen Ausfällung des Schwefelquecksilbers Schwefelwasserstoff einleitet; das farblose Filtrat darf keinen Abdampfrückstand hinterlassen. Schüttelt man das so gewonnene Schwefelquecksilber mit einer Mischung von 5 cm³ 20%iger Ammoniaklösung und 45 cm³ Wasser, so darf das Filtrat nach Ansäuern mit Salzsäure weder eine gelbe Farbe noch einen solchen Niederschlag zeigen, der auf Gegenwart von Arsen deuten würde. 1 g gepulvertes Quecksilberchlorid soll sich in 25 cm³ Äther klar lösen.

Sublimat dient hauptsächlich als Eiweißfällungsmittel, zur Enteiweißung von Blutserum etc., Gewinnung bestimmter Eiweißkomponenten (z. B. Histon).

Zinkchlorid, $ZnCl_2$.

darstellbar durch Verbrennen von Zink in Chlorgas, durch Erhitzen von Zinkfeile mit Sublimat und andere Methoden.

Es bildet eine weißgraue, halbdurchsichtige, wachsweiche, stark hygroskopische Masse von brennendem, ekelerregendem Geschmack. Bei Glühhitze sublimiert es in weißen Nadeln. Es wirkt stark beizend. An der Luft zieht es sehr leicht Wasser an und bildet dann zunächst ein Hydrat $ZnCl_2 + H_2O$. Die wässerige Lösung reagiert gegen Lackmuspapier sauer. Die wässerige Lösung von 1 g Zinkchlorid in 1 cm³ Wasser soll klar oder höchstens schwach getrübt sein. Bei Zusatz von 3 cm³ Alkohol entsteht ein flockiger Niederschlag, der auf Zusatz von 1 Tropfen verdünnter Salzsäure verschwinden soll. (Prüfung auf basisches Salz.)

Wichtig zum Nachweis des Kreatinins: Kreatininchlorzink.

Kreatininchlorzink, $(C_4H_7N_3O)_2 . ZnCl_2$, ist leicht löslich in Salzsäure und wird aus dieser Lösung durch Natriumacetat wieder gefällt.

Cadmiumchlorid, $CdCl_2 + 2H_2O$,

wird erhalten durch Behandeln von Cd, CdO, CdS, $CdCO_3$ mit Salzsäure und Eindampfen der Lösung. Durchsichtige, rechtwinklige Säulen, die in der Wärme leicht verwittern. Ungefähr gleich löslich in kaltem und warmem Wasser (140 bzw. 150 Teile in 100 Teilen); löslich in Alkohol.

Beim Schmelzen wird das wasserfreie Salz erhalten: durchsichtige Masse mit Perlenglanz, die bei der Sublimation glimmerartige Blättchen ergibt, welche an der Luft zu einem weißen Pulver zerfallen.

Anwendung zur Darstellung und Analyse der Lipoide (Lecithin).

Eisenchlorid, Fe_2Cl_6,

wird als Hydrat mit 6 Molekülen H_2O durch Einleiten von Chlor in eine Lösung des Chlorürs als gelbe kristallinische Masse erhalten. Sehr hygroskopisch; sehr leicht löslich, ferner in Alkohol und Äther. Siedepunkt 280—285°.

Die Lösungen reagieren sauer gegen Lackmuspapier.

10 g Eisenchlorid sollen sich in 10 cm^3 Wasser vollständig und klar lösen. Zur Prüfung auf Salzsäure bringt man etwas 50%ige Eisenchloridlösung in ein Uhrglas und hält darüber einen mit Ammoniak befeuchteten Glasstab. Die Bildung von Salmiaknebeln zeigt Verunreinigung mit Salzsäure an. Ein über die Öffnung einer Flasche mit Eisenchloridlösung gehaltenes, mit Jodzinkstärkelösung befeuchtetes Papier darf sich während einiger Minuten nicht bläuen (Prüfung auf Chlor). Behufs Prüfung auf Ferrosalz versetzt man eine 5%ige wässerige Lösung mit 1 cm^3 verdünnter Salzsäure und einigen Tropfen Ferricyankaliumlösung: es darf keine Blaufärbung (Turnbull-Blau) auftreten.

Anwendung als Reagens auf Phenole und von diesen ableitbare Verbindungen, die auf Zusatz von wässeriger Eisenchloridlösung charakteristische Farbenreaktionen geben.

Derivate des Brenzkatechins geben grünliche Färbung; wichtig unter anderem für den Nachweis des Adrenalins. Die Derivate der Salizylsäure geben violette bis blaue, die Nitrosalizylsäuren rote Färbung. Weniger ausgeprägt sind die Farbbildungen in der m- und p-Reihe, darunter m- und p-Kresol. Hydrochinon blaue Färbung; Resorcin dunkelviolett, Phloroglucin veilchenblau, Tyrosinsulfosäure violett, p-Oxybenzaldehyd violett, m-Oxybenzaldehyd keine Färbung, desgleichen Vanillinsäure. Eisenchloridreaktion geben die meisten Derivate der Pyridinreihe.

Eisenchlorid gibt mit Milchsäure zeisiggelbe Färbung: Anwendung zur *Uffelmann*schen Reaktion. Lösungen aliphatischer Aminosäuren färben sich mit wenig Eisenchloridlösung blutrot. Mit salzsauren Alkaloiden bildet Eisenchlorid gut kristallisierende, gelbe bis dunkelbraunrote Doppelsalze, in denen 1 Molekül Fe_2Cl_6 einem Molekül des salzsauren Alkaloids entspricht.

Anwendung als Reagens auf Acetessigsäure (*Gerhardt*sche Reaktion). Mit Alkaptonurikerharn gibt Eisenchloridlösung schnell vorübergehende Grünfärbung.

Kupfersulfat, (Kupfervitriol), $CuSO_4 + 5H_2O$,

wird dargestellt durch Erhitzen von Cu mit H_2SO_4, wobei außerdem Kupfersulfür und schweflige Säure entstehen; bei der Darstellung im großen wird Kupfer der gleichzeitigen Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure und Luft überlassen.

Es kristallisiert aus Wasser in lasurblauen, durchsichtigen, triklinen Kristallen, die unter Umständen sehr bedeutende Dimensionen erreichen. Das Salz ist leicht löslich in Wasser. Durch Erhitzen verliert es Kristallwasser: den größten Teil bei 180°, den Rest erst über 200°; das auf diesem Wege gewonnene wasserfreie Salz bildet eine weiße, undurchsichtige, leicht zerreibliche Masse, sonst farblose Kristalle, schöne weiße Prismen. Es nimmt begierig Wasser auf und wird daher vielfach zum Trocknen, z. B. von Äther, benutzt; sobald die Kristalle sich blau färben, sind sie zum Trocknen nicht mehr brauchbar.

Zur Prüfung auf Eisen erhitzt man eine mit $2\ cm^3$ Salpetersäure versetzte Lösung von $5\ g$ Kupfersulfat in $25\ cm^3$ Wasser zum Sieden, fügt $20\ cm^3$ einer Ammoniaklösung vom spezifischen Gewicht 0·96 zu, filtriert durch ein aschefreies Filter und wascht dieses mit ammoniakhaltigem Wasser bis zum völligen Verschwinden des Kupfers aus. Der Glührückstand des Filters mit Inhalt soll höchstens $0·001\ g$ betragen. Zu prüfen ist ferner auf eventuell vorhandene Kationen, nach Ausfällung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff.

Kupfersulfat findet in der physiologisch-chemischen Analyse vielfach Anwendung. Wie alle Schwermetallsalze fällt es Eiweiß: es bilden sich Kupferalbuminate. Es dient ferner zu Reduktionsproben, besonders zum Nachweis von Zucker (*Trommer*sche, *Fehling*sche Probe). Genuine Eiweißkörper, sowie Peptone, ferner manche Polypeptide geben mit konzentrierter Natronlauge und sehr wenig verdünnter Kupfersulfatlösung eine violette bis rote Färbung: Biuretreaktion.

Die Biuretreaktion tritt auf, wenn die betreffende Substanz zwei $CO.NH_2$-Gruppen, an einem C- oder N-Atom oder direkt miteinander vereinigt, besitzt, also bei den Typen:

$$H_2C\begin{cases}CONH_2\\CONH_2\end{cases} \qquad H.N\begin{cases}CONH_2\\CONH_2\end{cases} \qquad \begin{matrix}CONH_2\\|\\CO.NH_2\end{matrix}$$

(Malonamid) (Biuret) (Oxamid) (nach *Meyer*).

Kupferoxydlösung, erhalten durch Fällen von Kupfersulfatlösung mit Natronlauge, bildet mit Aminosäuren und Polypeptiden schön blaue Kupfersalze, indem das schwarze Kupferoxyd in Lösung geht. Sehr wertvolles Reagens, besonders auch zur Unterscheidung, ob freie COOH-Gruppen oder anhydridartige Bindungen vorliegen.

Lösungen von Aminosäuren färben sich auf Zusatz einiger Tropfen einer Lösung von Kupfersulfat (oder Kupferchlorid) intensiv blau.

Phosphorwolframsäure.

Die Wolframsäuren vereinigen sich mit Phosphorsäure zu hochmolekularen Verbindungen. Zur Darstellung solcher Verbindungen, in denen Phosphorsäure und Wolframsäure in wechselnden Mengen, abhängig vor allem von der Art der Herstellung, vorhanden sein können, wird z. B. nach *Drechsel* $500\ g$ möglichst reines Natriumparawolframat und $200\ g$ sekundäres Natriumphosphat in $500\ cm^3$ Wasser gelöst, man kocht und fügt 700—800 cm^3 Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1·14 zu, dampft ein, bis sich eine Kristallhaut bildet und schüttelt mit Äther. Die untere schwere Lösung gibt nach Verjagen des Äthers und Einengen die Säure. Diese Säure entspricht hauptsächlich der Zusammensetzung $P_2O_5 . 24\,WO_3 .$ H_2O. Das Verhältnis $P_2O_5 : WO_3$ ist für diese Verbindung 1 : 24. Ferner bestehen eine große Anzahl Verbindungen anderer Zusammensetzung, in denen das Verhältnis $P_2O_5 : WO_3$ zwischen 1 : 24 und 1 : 7 schwankt. Die

Phosphorwolframsäure *Merck* entspricht der Formel ($P_2O_5\,20\,WO_3$ . . H_2O) + $16\,H_2O$.

Nach *Merck* prüft man Phosphorwolframsäure auf Nitrat, indem man die Lösung von 1 *g* des Körpers in 10 *cm*³ Wasser mit einem Körnchen Chlornatrium, einem Tropfen einer Indigolösung von 1 : 1000 und sodann mit 10 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die blaue Farbe der Mischung darf innerhalb 10 Minuten nicht verschwinden. Zur Prüfung auf Ammoniumsalze wird die Lösung von 1 *g* Phosphorwolframsäure in 10 *cm*³ Wasser mit 5 *cm*³ 33⁰/₀iger Natronlauge erwärmt. Es darf dabei Ammoniak nicht entweichen.

Die Phosphorwolframsäuren sind in saurer Lösung beständig. Mit Quecksilbernitrat entsteht ein gelber, in Wasser fast unlöslicher Niederschlag. Der Geschmack der Phosphorwolframsäuren ist meist bitter. Beim Kochen mit Alkali werden sie in ihre Komponenten gespalten. Versetzt man eine Wolframatlösung mit Zinnchlorür ($SnCl_2$), so entsteht ein gelber Niederschlag von Wolframtrioxyd (WO_3) [Wolframsäure]. Nach Zugabe von Salzsäure erhält man beim Erwärmen eine prächtig blaue Lösung von W_2O_5. Reduktionswirkung durch den naszierenden Wasserstoff. Weitere Reaktionen auf WO_3 (sehr empfindlich): Rotfärbung durch Phenol, Violettfärbung durch Hydrochinon.

Phosphorwolframsäure gibt kopiöse, schwer lösliche Fällungen mit Alkaloiden, Eiweißstoffen und deren höheren Spaltprodukten. Sie bildet besonders ein wertvolles Mittel zur Trennung niederer Eiweißspaltstücke (Aminosäuren, Polypeptide) von höheren Abbauprodukten bzw. genuinen Eiweißkörpern. Gefällt werden durch Phosphorwolframsäure Lysin, Arginin, Histidin, in etwas geringerer Verdünnung auch die Diaminotrioxydodekansäure.

Phosphormolybdänsäure, Präparat *Merck*: $12\,MoO_3 . H_3PO_4 + x\,H_2O$.

Kommt wie Phosphorwolframsäure in einer Reihe verschiedener Modifikationen vor, in denen das Verhältnis $P_2O_5 : MO_3$ zwischen 1 : 24 und 1 : 5 schwankt. Sie dient ebenso wie die Phosphorwolframsäure als Fällungsmittel hochkomplexer Verbindungen.

1 *g* Phosphormolybdänsäure soll sich nach *Merck* in 10 *cm*³ Wasser vollständig lösen. Nach Zusatz von 2—3 Tropfen Ammoniaklösung scheidet die Lösung einen gelben Niederschlag ab, der im Überschuß von Ammoniak vollständig gelöst wird. Fügt man hierzu Schwefelammonium oder Ammoniumoxalatlösung, so darf keine Veränderung eintreten.

Über-Osmiumsäure, OsO_4 (Osmiumtetroxyd).

weiße kristallinische Masse, die bei 100⁰ zu einer öligen Flüssigkeit schmilzt. Es schmeckt ätzend und riecht sehr unangenehm, ähnlich wie Chlor. Die Dämpfe sind sehr giftig (Gegengift Einatmung von Schwefelwasserstoff). In Wasser ist es langsam löslich, bei Erhitzen schmilzt es in

Wasser. Die alkoholische und ätherische Lösung wird beim Stehen, besonders am Sonnenlicht, reduziert. Durch Metalle wird meist Osmium ausgeschieden. Durch Gerbsäure wird Blaufärbung erzeugt, durch Schwefelwasserstoff und Schwefelammonium ein braunschwarzer bis schwarzer, in letzterem unlöslicher Niederschlag ausgefällt.

Die Lösung von Osmiumtetroxyd in Wasser macht aus JK J frei, sie entfärbt Indigolösung. Durch eine Reihe organischer Körper wird sie reduziert, wobei sich schwarzes Osmium (Osmiumhydroxyd?) abscheidet. Alkohol wird durch OsO_4 zu Aldehyd und Essigsäure oxydiert, Kohlenhydrate, auch Glycerin zu Oxalsäure und Essigsäure; oxydiert werden ferner Harnsäure, Terpentinöl, Salicin, Fette. Von dieser Reaktion — Schwarzfärbung entsprechender Stellen — wird in der Mikroskopie besonders zum Fettnachweis Gebrauch gemacht.

Nach *Meyer* geben nur Substanzen mit doppelter oder dreifacher Bindung Schwarzfärbung, während gesättigte unverändert bleiben. Mehrwertige Phenole verhalten sich wie ungesättigte Lösungen.

5. Verschiedene Reagentien.

Alkalische Bariumchloridlösung. Besteht aus 2 Volumen Barytwasser und 1 Volumen Bariumchloridlösung.

*Alméns*che Lösung. 4 *g* Tannin, 8 *cm*³ Essigsäure, 190 *cm*³ Alkohol 50%ig.

Ammoniak verdünnt. Eine Lösung mit 10% Ammoniakgehalt und vom spezifischen Gewicht 0·96.

Ammoniumchloridlösung. 1 Teil Salmiak auf 10 Teile Wasser.

Ammoniumkarbonatlösung. 1 Teil Ammoniumkarbonat, 1 Teil Ammoniak, 4 Teile Wasser.

Ammoniumoxalatlösung. 1 Teil Ammoniumoxalat auf 25 Teile Wasser.

Ammoniumsulfatlösung, gesättigt. 780 *g* Ammoniumsulfat in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Bariumchloridlösung. 1 Teil : 10 Teile Wasser.

Bariumnitratlösung. 1 Teil Salz auf 12 Teile Wasser.

Barytwasser. 1 Teil kristallisiertes Bariumhydroxyd wird in 15 Teilen Wasser kochend gelöst und die Lösung noch heiß filtriert. Beim Erkalten scheiden sich Kristalle von Bariumhydrat aus, während die darüberstehende Lösung gesättigt ist.

Barfoeds Reagens (auf Zucker). 66 *g* Kupferacetat und 10 *g* Eisessig werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Bleiacetatlösung. 1 Teil Salz auf 10 Teile Wasser.

Bromwasser. Destilliertes Wasser wird mit einem Überschuß von Brom geschüttelt und die Lösung stehen gelassen.

Brückes Reagens (auf Eiweiß). 50 *g* Jodkalium in 500 *cm*³ Wasser werden mit Quecksilberjodid (120 *g*) gesättigt und auf 1 *l* aufgefüllt.

Curcumapapier. Gepulverte Curcumawurzeln werden mit Alkohol extrahiert, in das Extrakt wird Fließpapier eingetaucht und dann trocknen gelassen.

Diazoreagens. Lösung I: 5 *g* Sulfanilsäure, 50 cm^3 Salzsäure 1·14, 1000 cm^3 destilliertes Wasser. Lösung II: 0·5 *g* Natriumnitrit, 100 cm^3 destilliertes Wasser.

Eisenchloridlösung. Enthält 1 Teil Eisenchlorid auf 10 Teile Wasser.

Esbachs Reagens. 10 *g* Pikrinsäure und 10 *g* Zitronensäure werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Essigsäure. Acidum aceticum dilutum der Pharmakopoe mit einem Gehalt von 30%iger wasserfreier Essigsäure.

*Fehling*sche Lösung. *a)* 69·2 *g* Kupfersulfat werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt. *b)* 346 *g* Seignettesalz und 120 *g* Natriumhydrat werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt. Zur Reaktion werden gleiche Teile der beiden Lösungen vermischt.

Folins Reagens auf Harnsäure. 500 *g* Ammoniumsulfat, 5 *g* Uranacetat und 6 *g* Eisessig werden in 650 cm^3 Wasser gelöst.

Ferrocyankaliumlösung. Enthält 1 Teil in 10 Teilen Wasser.

Glyoxylsäurelösung. 10 *g* Magnesiumpulver werden mit Wasser überschichtet und unter Kühlung vorsichtig 250 cm^3 einer gesättigten Oxalsäurelösung zugefügt. Das Magnesiumoxalat wird abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäure angesäuert und auf 1 *l* aufgefüllt.

Guajaktinktur. 1 Teil Guajak wird in 100 cm^3 Alkohol aufgelöst.

Günzburgs Reagens. 2 *g* Phloroglucin und 1 *g* Vanillin werden in 30 cm^3 Alkohol absolutus gelöst.

Jodjodkalilösung. 20 *g* Jodkalium werden in 1000 cm^3 Wasser gelöst, und darin 10 *g* Jod aufgelöst.

Kaliumchromatlösung. Enthält 1 Teil in 20 Teilen Wasser.

Kalilauge, 33%ig. 1 Teil Kalihydrat in 2 Teilen Wasser.

Kupfersulfatlösung. 1 Teil in 10 Teilen Wasser. Für die Anstellung der Biuretreaktion muß diese Lösung noch bedeutend (ungefähr auf das 5fache) verdünnt werden.

Natriumchloridlösung, kalt gesättigt. Enthält in 100 Teilen 31·84 *g* Kochsalz.

Natriumchloridlösung, physiologische ist für Kaltblüter 0·6%ig, für Warmblüter 0·85—0·9%ig.

Natronlauge, 33%ig. 1 Teil Natronhydrat und 2 Teile Wasser.

Natronlauge, verdünnte. Enthält in 100 cm^3 15 *g* Natronhydrat.

Natriumphosphatlösung. 1 Teil sekundäres Natriumphosphat auf 100 Teile Wasser.

Natriumkobaltnitritlösung. 5 *g* Kobaltnitrat werden in 90 cm^3 Wasser gelöst, 10 g Natriumnitrit und 10 cm^3 Essigsäure zugefügt, und die Lösung filtriert. Wenn spontan Rotfärbung auftritt, muß etwas Nitrit und Essigsäure zugefügt werden.

Neßlers Reagens. 50 *g* Jodkalium werden in 50 *cm*³ heißem destillierten Wasser gelöst und konzentrierte heiße Quecksilberchloridlösung so lange hinzugefügt, bis der sich bildende rote Niederschlag nicht mehr verschwindet. Es wird filtriert, das Filtrat mit einer Lösung von 150 *g* Kalihydrat in 300 *cm*³ destilliertem Wasser und einigen Kubikzentimetern der Quecksilberchloridlösung versetzt und nach dem Erkalten auf 1 *l* aufgefüllt. In gut schließender Flasche aufbewahren. Der sich bildende Niederschlag schließt die Verwendbarkeit nicht aus, es muß nur sorgfältig von ihm abpipettiert werden.

Nylanders Reagens. 2 *g* basisch salpetersaures Wismut und 4 *g* Seignettesalz werden in 100 *cm*³ einer 8%igen Natronlauge gelöst.

Magnesiamischung. 55 *g* Magnesiumchlorid, 70 *g* Salmiak und 125 *cm*³ Ammoniak vom spezifischen Gewicht 0·88 werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Magnesiumsulfatlösung, gesättigt. 600 *g* kristallisiertes Magnesiumsulfat wird in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Millons Reagens. 1 Teil metallisches Quecksilber wird in 2 Teilen Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·4 unter Erwärmen gelöst und 1 Volumen der erhaltenen Lösung mit 2 Volumen Wasser verdünnt.

Obermayers Reagens. 4 *g* Eisenchlorid werden in 1 *l* Salzsäure 1·19 gelöst.

Oxalsäurelösung, gesättigt. 100 *g* Oxalsäure gelöst in 1000 *cm*³ Wasser.

*Pavy*sche Lösung. 120 *cm*³ *Fehling*scher Lösung und 300 *cm*³ Ammoniak vom spezifischen Gewicht 0·88 werden mit Wasser auf 1 *l* verdünnt.

Quecksilbernitratlösung. 10 *g* Salz werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Pikrinsäurelösung. 12 *g* Pikrinsäure werden in Wasser gelöst und auf 1 *l* aufgefüllt.

Salpetersäure, konzentriert. Spezifisches Gewicht 1·40, ungefähr 65% Säure enthaltend, 14·5mal normal.

Salpetersäure, verdünnt. 1 *l* der konzentrierten Salpetersäure wird mit 2 *l* Wasser verdünnt. Spezifisches Gewicht 1·17, ungefähr 5mal normal.

Salzsäure, konzentriert. Spezifisches Gewicht 1·19, ungefähr 12mal normal.

Salzsäure, verdünnt, aus 1 *l* konzentrierter Säure + 1·5 *l* Wasser, spezifisches Gewicht 1·08, ungefähr 17% HCl enthaltend, ungefähr 5fach normal.

Schwefelsäure, konzentriert. Spezifisches Gewicht 1·84, fast reine Säure, ungefähr 36fach normal.

Schwefelsäure, verdünnt. Spezifisches Gewicht 1·16 mit 21% H_2SO_4; aus 1 *l* konzentrierter Säure + 6·4 *l* Wasser; ungefähr 5fach normal.

Salpetermischung. Enthält 2—3 Teile Kaliumnitrat und 1 Teil Natriumkarbonat.

Uffelmanns Reagens. Zu einer 2—5%igen Karbolsäurelösung werden wenige Topfen Eisenchloridlösung zugefügt, bis die Lösung blau wird.

Zinkchloridlösung, alkoholische. Eine sirupöse wässerige Lösung von Chlorzink wird mit Alkohol bis zur Erreichung eines spezifischen Gewichtes von 1·2 verdünnt.

Indikatoren.

Alizarinlösung. Angewandt eine 1%ige Lösung. Mit Säuren grüngelb, mit Laugen violett.

Cochenilletinktur wird hergestellt durch Übergießen von 3 *g* Farbstoff der gepulverten Läuse mit 250 Teilen 20—25%igem Alkohol.

Kongorot wird in verdünntem Alkohol gelöst. Es ist in alkalischer Lösung feuerrot, in saurer Lösung tiefblau.

Lackmoid. Der Farbstoff wird zur Sättigung in 98%igem Alkohol gelöst. Zu 100 cm^3 der filtrierten Lösung werden 10 cm^3 einer 2%igen alkoholischen Lösung von Malachitgrün zugesetzt. Besonders gut für Arbeiten bei Gasglühlicht. Für Kjeldahl zu empfehlen.

Lackmustinktur. Lackmuskörner werden mit siedendem Wasser ausgekocht, vom ungelösten heiß dekantiert, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und wieder aufgekocht. Man läßt die Lösung 1—2 Tage kalt stehen und dialysiert dann gegen stets zu wechselndes, destilliertes Wasser, bis die Farblösung schwefelsäurefrei ist. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit kann etwas Smaragdgrün zugesetzt werden.

Methylorange. Angewandt wird eine 0·2%ige Lösung in destilliertem Wasser. Eignet sich nur für starke Mineralsäuren, dagegen für starke und schwache Basen. Färbt sich mit Säuren rotorange, mit Alkalien gelb.

Phenolphtalein. Angewandt wird eine 1%ige alkoholische Lösung, die sich mit Alkalien rot färbt, mit Säuren farblos bleibt.

Rosolsäure. Benutzt wird eine alkoholische Lösung, von der nur wenig zuzusetzen ist. Mit Säuren bleibt die Farbe gelb, mit Laugen tritt Rosa- bis Rotfärbung auf. Gut geeignet für Kjeldahl.

Register.

[illegible]

B.

C.

G.

H.

I.

J.

K.

L.

N.

O.

P.

Q.

R.

S.

T.

X.

Z.

Nachträge und Berichtigungen.

Auf Seite 904. Im Kapitel, welches die biologische Absorption behandelt, soll es wie folgt heißen:

Die Lösung wird hernach sterilisiert und für die sterilisierten Röhren mit Chloroform versetzt.

Ebenso soll es auf der gleichen Seite bei den Versuchen über die Absorption des Phosphat-Ions folgendermaßen lauten:

Zur Bestimmung des biologischen Absorptionsvermögens des Phosphat-Ions wird die Lösung so zubereitet, daß man 25·2 *g* $CaH_4(PO_4)_2 . H_2O$ (chemisch rein) in 2000 cm^3 Wasser löst, diese Lösung sterilisiert und für die sterilisierten Röhren mit einer genügenden Menge von Chloroform versetzt.

Seite 614. Schluß des ersten Abschnittes. Ferner S. 624, S. 615. Herr Dr. *Parnas* verwahrt sich in einem Briefe an den Herausgeber gegen die Angabe, als hätte er das betreffende Verfahren von *S. Fraenkel* übernommen. Seine Arbeit 1. über Kephalin trägt das redaktionelle Einlaufsdatum vom 4. Oktober 1909, diejenige *Fraenkels* 2. ist am 9. Oktober 1909 erschienen: vgl. 1. Bioch. Zeitschr. 22. S. 411 (1909); 2. Bioch. Zeitschr. 21. S. 321. Was in beiden Arbeiten in gleicher Weise angewandt wird, das sind ältere Arbeiten anderer Forscher oder entnommene Methoden. So die Acetonhärtung; 3. Biochem. Zeitschr. 19. S. 254, erschienen in der ersten Augustwoche 1909; 4. *Rosenheim,* Journ. of Phys. 34 (1906); 5. Zeitschr. für physiol. Chem. 49. S. 286 (1906); 6. Handbuch. V. S. 631 und Biochem. Zeitschr. 19. S. 254; Über die Extraktion und Fällung: 7. Zeitschr. für physiol. Chem. 36. 134 (1902); 8. *Thudichum,* Chemische Konstitution des Gehirns. 1901 passim; Über Petroläther: 9. Glikin. *Pflügers* Arch. 95. *I. Bang,* Erg. d. Phys. 6. 147, 148; 10. l. c. S. 129; 11. Journ. de Pharm. et de Chim. 24. S. 101 (1906).

Hingegen hält *Fraenkel* seine Behauptungen vollinhaltlich aufrecht, da seine Methodik in ihren Grundzügen vor der Publikation von *Parnas* dreimal veröffentlicht wurde, und zwar in *Asher-Spiro*: **1.** Ergebnisse der Physiologie. VIII. Jahrg. S. 212—253 (1909). **2.** Biochem. Zeitschr. **19.** S. 254 (1909). **3.** Biochem. Zeitschr. **21.** 321 (1909).

Emil Abderhalden.

Druck von Gottlieb Gistel & Cie., Wien, III., Münzgasse 6.



